

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292781** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.31

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.09.01

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/212,851; 62/216,043; 62/257,195**

(32) **2015.09.01; 2015.09.09; 2015.11.18**

(33) **US**

(62) **201890630; 2016.09.01**

(71) Заявитель:

**ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US); ЛЮДВИГ
ИНСТИТЮТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ ЛТД (СН); МЕМОРИАЛ
СЛОАН КЕТТЕРИНГ КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:

**Ван Дейк Марк (NL), Мундт
Корнелия Анне (DE), Ритгер Герг,
Волчок Джедд Дэвид, Мергхуб Таха,
Запасоди Роберта, Холмгард Рикке
Бек, Шаер Дэвид, Савицкий Дэвид
Адам, Уилсон Николас Стюарт (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител.

A1

202292781

202292781

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**ОПИСАНИЕ****РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка притязает на преимущество предварительных заявок на патент США № 62/212851, поданной 1 сентября 2015; 62/216043, поданной 9 сентября 2015; и 62/257195, поданной 18 ноября 2015, каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1, и способам их применения.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) является ингибирующим членом семейства рецепторов CD28. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. (1996), *Int. Immunol.*, 8: 765-72; Okazaki et al. (2002), *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 391779-82; Bennett et al. (2003), *J. Immunol.*, 170: 711-8). PD-1 представляет собой трансмембранный белок типа 1 в 55 кДа, который является частью суперсемейства генов Ig и содержит мембранный проксимальный иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и переключающий мотив на основе мембранного дистального тирозина (ITSM) (Thomas M. L. (1995), *J. Exp. Med.*, 181: 1953-6; Vivier E. and Daeron M. (1997), *Immunol. Today*, 18: 286-91). Идентифицированы два лиганда для PD-1 PD-L1 и PD-L2, которые, как показано, даунрегулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al. (2000), *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34; Latchman et al. (2001), *Nat. Immunol.*, 2: 261-8; Carter et al. (2002), *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-43). PD-L1 часто встречается при многих онкозаболеваниях человека (Dong et al. (2002), *Nat. Med.*, 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к снижению опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижению пролиферации, опосредуемой Т-клеточными рецепторами, и избеганию раковыми клетками иммунного надзора (Dong et al. (2003), *J. Mol.*

Med., 81: 281-7; Blank et al. (2005), Cancer Immunol. Immunother., 54: 307-314; Konishi et al. (2004), Clin. Cancer Res., 10: 5094-100). Такую иммуносупрессию можно реверсировать путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 99: 12293-7; Brown et al. (2003), J. Immunol., 170: 1257-66).

[0003] PD-1 является ингибирующей молекулой иммунных клеток. У животных с недостатком PD-1 развиваются различные аутоиммунные фенотипы, включая аутоиммунную кардиомиопатию и волчаночноподобный синдром с артритом и нефритом (Nishimura et al. (1999), Immunity, 11: 141-51; Nishimura et al. (2001), Science, 291: 319-22). Кроме того, также обнаружено, что PD-1 играет некую роль в аутоиммунном энцефаломиелите, системной красной волчанке, болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), диабете типа I и ревматоидном артрите (Salama et al. (2003), J. Exp. Med., 198: 71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004), Hum. Mol. Genet., 13: R143; Nielsen et al. (2004), Lupus, 13: 510). Показано, что в линии мышечных опухолевых В-клеток ITSM PD-1 существенен для блокады BCR-опосредованного потока Ca^{2+} и фосфорилирования тирозина следующих далее эффекторных молекул (Okazaki et al. (2001), PNAS, 98: 13866-71).

[0004] Принимая во внимание роль человеческого PD-1 в модулирующих иммунных реакций, терапевтические средства, созданные для антагонизации передачи сигнала PD-1, считаются весьма перспективными для лечения заболеваний, которые включают иммуносупрессию, опосредуемую PD-1.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например, опосредуемую PD-1 иммуносупрессию. Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител, и способам лечения

пациента с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или ослабления Treg-опосредуемой иммуносупрессии и, следовательно, для лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

[0006] Соответственно, в одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где X₁ представляет собой Y или F; X₂ представляет собой K или E; и X₃ представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), где X₁ представляет собой G или V; и X₂ представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[0007] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-46.

[0008] В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[0009] В некоторых воплощениях CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[0010] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный

участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[0011] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[0012] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

[0013] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях

антитело включает тяжелую цепь, включающую переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[0014] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50).

[0015] В некоторых воплощениях антитело включает

вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях вариабельный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0016] В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0017] В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, где вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

[0018] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0019] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0020] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0021] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0022] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0023] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0024] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0025] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50), и (b) переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0026] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a)

вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (b) вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0027] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

[0028] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0029] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0030] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0031] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0032] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0033] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

23, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0034] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0035] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0036] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0037] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0038] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0039] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID

NO: 32), где X_1 представляет собой Y или F; X_2 представляет собой K или E; и X_3 представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX_1DX_2 (SEQ ID NO: 33), где X_1 представляет собой G или V; и X_2 представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[0040] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36.

[0041] В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[0042] В некоторых воплощениях CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7;; 1, 2 и 37;; 1, 34 и 7;; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[0043] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[0044] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[0045] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

[0046] В некоторых воплощениях антитело включает

вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[0047] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50).

[0048] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0049] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0050] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, где переменный участок тяжелой цепи и переменный

участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

[0051] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0052] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0053] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0054] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0055] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и (b) переменный участок

легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0056] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0057] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0058] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0059] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50), и (b) переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0060] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически

связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

[0061] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0062] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0063] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0064] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0065] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0066] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0067] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0068] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0069] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0070] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0071] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0072] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с любым антителом,

раскрытым в настоящем описании. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается, с эпитопом человеческого PD-1. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74.

[0074] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу, для которого, после связывания антитела с

человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий.

[0075] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению. В предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-138 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с

эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74, и/или эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74, и/или включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. Связывание с эпитопом предпочтительно определяют анализом Pepscan, в частности, как описано в примерах. Например, связывание с более чем одной из вышеуказанных последовательностей эпитопов человеческого PD-1 может происходить в случае прерывистых эпитопов.

[0076] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В более предпочтительном воплощении после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же

участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий, и после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. Например, связывание с более чем одной из вышеуказанных последовательностей эпитопов человеческого PD-1 может происходить в случае прерывистых эпитопов.

[0077] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, причем эпитоп определяют по обмену водород-дейтерий (HDX), в частности, как описано в примерах, или анализом Pepscan, в частности, как описано в примерах, предпочтительнее по обмену водород-дейтерий.

[0078] Следующие далее воплощения применимы ко всем вышеуказанным аспектам.

[0079] В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, который теряет гликановую группу в позиции N297 согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи

человеческого IgG₄, включающего мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

[0080] В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG, который является вариантом константного участка тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, причем вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим Fc-рецептором с меньшей аффинностью, чем связывается константный участок тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа с человеческим Fc-рецептором. В некоторых воплощениях человеческий Fc-рецептор представляет собой FcγR. В некоторых воплощениях FcγR представляет собой FcγRIIB. В некоторых воплощениях FcγR экспрессируется на клетке, выбранной из группы, включающей дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты, В-клетки и природные киллерные клетки. В некоторых воплощениях вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₁, вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₂ или вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₄. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из человеческих IgGκ IgGλ.

[0081] В некоторых воплощениях антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых воплощениях антитело является антагонистичным к человеческому PD-1. В некоторых воплощениях антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность человеческого PD-1. В некоторых воплощениях антитело ингибирует связывание человеческого PD-1 с человеческим PD-L1 или с человеческим PD-L2. В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA). В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IFNγ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток. В некоторых воплощениях антитело повышает пролиферацию анти-CD3-антителостимулированных CD4+ или CD8+ Т-

клеток, культивированных вместе с асцитической жидкостью при раке яичников. В некоторых воплощениях антитело усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазных репортерных клетках, культивированных совместно с PD-L1-экспрессирующими клетками-мишенями.

[0082] В некоторых воплощениях антитело, раскрытое в настоящем описании, конъюгируют с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклеидом или детектируемой меткой.

[0083] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции, включающей антитело, раскрытое в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

[0084] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к полинуклеотиду или изолированному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую и/или легкую цепь антитела, раскрытого в настоящем описании. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к вектору, включающему полинуклеотид. В еще одном аспекте настоящее раскрытие относится к рекомбинантной клетке-хозяину, включающей полинуклеотид или вектор. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу получения антитела, которое связывается с человеческим PD-1, причем способ включает культивирование клетки-хозяина таким образом, что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется антитело. В предпочтительном воплощении способ является способом *in vitro*.

[0085] В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

[0086] В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве диагностического средства.

[0087] В одном воплощении настоящее изобретение относится к

применению антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтических композиций или лекарственных средств для иммунотерапии. Предпочтительно иммунотерапия предназначена для повышения активности Т-клеток, необязательно, для лечения рака или лечения или предупреждения инфекционного заболевания.

[0088] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании.

[0089] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию доставляют в дренирующий опухоль лимфоузел. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят интраартериально.

[0090] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген.

[0091] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

[0092] В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

[0093] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению.

[0094] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы,

раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0095] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (T-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0096] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к

герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0097] В предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию, вводят подкожно или внутривенно. В другом предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию, вводят интратуморально или интраартериально.

[0098] В некоторых воплощениях вышеуказанные способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. Поэтому, в одном предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения в способе по настоящему изобретению способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

[0099] В одном аспекте настоящее изобретение относится к (a) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного средства.

[00100] В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака.

[00101] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство.

[00102] В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, антагонистическое анти-CD137 антитело, антагонистическое анти-ICOS антитело, антагонистическое анти-GITR антитело и антагонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях ингибитор выбирают из группы, включающей эпакадостат, F001287, индоксимод и NLG919. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой вакцину. В некоторых воплощениях вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является hsc70 и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является белок gp96 и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным пептидом, причем HSPPC происходит из опухоли, полученной от

субъекта. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство включает TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой адъювант. В одном аспекте настоящее изобретение относится к (a) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, а также их применению для получения лекарственных средств, и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (a) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00103] **фигуры 1A, 1B, 1C и 1D** представляют собой графики, показывающие связывание анти-PD-1 антител с активированными первичными Т-клетками человека или яванского макака при измерении проточной цитометрией. Вычисляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и строят график зависимости от интервала концентраций антител. На фигуре 1A измеряют связывание AGEN2046w, AGEN2047w и изотипического контрольного человеческого IgG₁ с человеческими CD4⁺ Т-клетками, стимулированными

стафилококковым энтеротоксином А (SEA). AGEN2034w и изотипический контрольный человеческий IgG₄ испытывают против человеческих CD4⁺ Т-клеток, стимулированных SEA (фигуры 1B и 1D), и CD4⁺ Т-клеток яванского макака, стимулированных стафилококковым энтеротоксином В (SEB) (фигура 1C).

[00104] **фигура 2** представляет собой график, показывающий связывание AGEN2034w с человеческим PD-1-Fc, человеческим ROBO2-Fc, человеческим B7-H7-Fc или SIRPγ-His. Взаимодействие измеряют по технологии «suspension array», и строят график зависимости средней интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации антитела.

[00105] **фигуры 3A, 3B, 3C, 3D, 3E и 3F** представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинатных PD-L1-Fc и/или PD-L2-Fc с гранулами, связанными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител. На фигурах 3A, 3B, 3C и 3D испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w, соответственно. На фигурах 3E и 3F подобные результаты показаны для AGEN2034w и изотипического контрольного антитела.

[00106] **фигуры 4A, 4B, 4C, 4D, 4E и 4F** представляют собой графики, отображающие функциональную активность анти-PD-1 антител на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фигура 4A представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное анти-PD-1 антителами AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипическим контрольным IgG₁. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2. Фигура 4B представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2 в присутствии титрования дозы AGEN2034w по сравнению с изотипическим контролем. Величины ошибок представляют стандартное отклонение. AGEN2034w или контрольное изотипическое антитело проверяют в присутствии или в отсутствие анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (фигура 4C), анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фигура 4D), анти-CD137 антитела rab2225 (фигура 4E) или анти-OX40 антитела rab1928 (фигура 4F).

[00107] **Фигуры 5А, 5В и 5С** являются результатами исследований при проверке влияния сцепления рецептора Fc-гамма (Fc γ R) на антагонистическую активность анти-PD-1 антител в отношении первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фигура 5А представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, стимулированное эталонным анти-PD-1 антителом или изотипическим контролем в присутствии или в отсутствие анти-CD16 антитела. Фигура 5В является результатом подобного исследования по проверке секреции IL-2, индуцированной AGEN2034w или изотипическим контролем в присутствии изотипического контроля, анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела. Фигура 5С представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное AGEN2047w с Fc-участком человеческого IgG₁ дикого типа, тремя соответствующими мутантами Fc (N297A, S267E/L328F и S239D/A330L/I332E) и их соответствующими изотипическими контролями. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2.

[00108] **Фигура 6** представляет собой график, показывающий продуцирование IFN γ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии изотипического контрольного антитела или анти-PD-1 антитела AGEN2034w. Показаны средние величины (величины ошибок) IFN γ .

[00109] **Фигуры 7А, 7В и 7С** являются результатами анализов по измерению пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом Т-клеток после совместного культивирования с асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела. Фигуры 7А и 7В представляют собой характерные гистограммы, показывающие флуоресценцию CFSE от CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, соответственно, в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в концентрации 10 мкг/мл. Фигура 7С представляет собой график, показывающий результаты подобного исследования. На фигуре 7С пролиферация CD4⁺ Т-клеток при измерении путем разведения CFSE нормализована к пролиферации CD4⁺ Т-клеток в отсутствие

асцитической жидкости при раке яичников, и построен график в зависимости от концентраций антитела.

[00110] **фигура 8** представляет собой график, показывающий реакцию в репортерном анализе Юрката-NFAT-люцифераза, вызванную анти-PD-1 антителом AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом IgG₄. Реакцию, измеренную по экспрессии люциферазы, нормализуют к реакции, вызванной в присутствии изотипического контрольного антитела при наименьшей испытываемой концентрации (свернутая индукция), и строят график в зависимости от концентраций антитела.

[00111] **фигуры 9A, 9B, 9C, 9D, 9E и 9F** представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинантных PD-L1-Fc и PD-L2-Fc с гранулами, соединенными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител AGEN2001w (фигура 9A), AGEN2002w (фигура 9B), EP11_p11_B03 (фигура 9C), EP11_p11_B05 (фигура 9D), EP11_p11_C02 (фигура 9E) или EP11_p11_C03 (фигура 9F).

[00112] **фигура 10** представляет собой график, отображающий функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного IgG₁ на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA, показанной по продуцированию IL-2. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00113] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например, опосредованную PD-1 иммуносупрессию. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, следовательно, для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного

заболевания у субъекта. Все примеры «изолированных антител», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «изолированных полинуклеотидов», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «антител», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «полинуклеотидов», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости.

5.1. Определения

[00114] Используемые в настоящем описании термины «примерно» и «приблизительно», когда используются для модификации числовой величины или числового интервала, показывают, что отклонения в до 5%-10% выше и до 5%-10% ниже величины или интервала остаются в рамках предполагаемого значения названной величины или интервала.

[00115] Используемый в настоящем описании термин «PD-1» относится к белку программируемой гибели клеток 1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности PD-1 хорошо известны в технике. Пример аминокислотной последовательности человеческого PD-1 представлен в депозите GenBank GI: 167857792.

[00116] Используемые в настоящем описании термины «антитело» и «антитела» включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, включающие участки антитела CDR, VH или VL. Примеры антител включают моноклональные антитела, полученные рекомбинантно антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, включающие молекулы с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями, легкоцепной мономер антитела, тяжелоцепной мономер антитела, легкоцепной димер антитела, тяжелоцепной димер

антитела, пару легкоцепное-тяжелоцепное антитело, интрацеллюлярное антитело, гетероконъюгаты антител, конъюгаты антитело-лекарство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепные антитела или одноцепные Fvs (scFV), камелизованные антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab)'₂, дисульфидсоединенные Fvs (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антианти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любых из указанных выше антител. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любым типом (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любым классом (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любым подклассом (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, являются антителами IgG или его класса (например, человеческим IgG₁ или IgG₄) или подкласса. В конкретном воплощении антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В конкретном воплощении антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой антитело IgG₁ или IgG₂.

[00117] Используемые в настоящем описании термины «VH участок» и «VL участок» относятся к отдельным переменным участкам тяжелой и легкой цепи антитела, соответственно, включая FR (каркасные участки) 1, 2, 3 и 4 и CDR (определяющие комплементарность участки) 1, 2 и 3 (см. статью Kabat *et al.*, (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00118] Используемый в настоящем описании термин «CDR» или «определяющий комплементарность участок» обозначает непоследовательные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в переменном участке как тяжелоцепных, так и легкоцепных полипептидов. Такие определенные участки описаны в статьях Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252, 6609-6616 (1977), и Kabat *et al.*,

Sequences of protein of immunological interest (1991); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987), и MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996), полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок, где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении одних с другими. Предпочтительно термин «CDR» относится к CDR по определению Кабат, основанном на сравнениях последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[00119] Используемый в настоящем описании термин «нумерация системы EU» относится к решению EU по нумерации для константных участков антитела, описанному в Edelman G.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969), и Kabat *et al.*, в «Sequences of Proteins of Immunological Interest», U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

[00120] Используемый в настоящем описании термин «аминокислотные остатки каркаса (FR)» относится к аминокислотам в каркасном участке цепи иммуноглобулина. Термин «каркасный участок» или «FR участок», используемый в настоящем описании, включает аминокислотные остатки, которые являются частью переменного участка, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Кабат).

[00121] Используемые в настоящем описании термины «переменный участок» и «переменный домен» используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Переменный участок типично относится к части антитела, как правило, части легкой или тяжелой цепи, типично, примерно 110-125 аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и примерно 90-115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности определенного антитела для его определенного антигена. Переменность в последовательности концентрируется в таких участках, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), в то время как более консервативные участки в переменном домене называют каркасными

участками (FR). В некоторых воплощениях переменный участок является человеческим переменным участком. В некоторых воплощениях переменный участок включает CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные участки (FR). В отдельных воплощениях переменный участок является переменным участком примата (например, примата, не являющегося человеком). В некоторых воплощениях переменный участок включает CDR грызуна или мыши и каркасные участки примата (FR) (например, примата, не являющегося человеком).

[00122] Термины «VL» и «VL домен» используются взаимозаменяемо в отношении переменного участка легкой цепи антитела.

[00123] Термины «VH» и «VH домен» используются взаимозаменяемо в отношении переменного участка тяжелой цепи антитела.

[00124] Используемый в настоящем описании термин «константный участок» и «константный домен» используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Константный участок представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, который не вовлекается непосредственно в связывание антитела с антигеном, но который может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc рецептором (например, с Fc-гамма рецептором). Константный участок молекулы иммуноглобулина как правило имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно переменного домена иммуноглобулина.

[00125] Используемый в настоящем описании термин «тяжелая цепь», когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, который дает начало классам IgA, IgD, IgE, IgG и IgM антител, соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄.

[00126] Используемый в настоящем описании термин «легкая

цепь», когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в технике. В конкретных воплощениях легкая цепь является человеческой легкой цепью.

[00127] «Аффинность связывания» обычно относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в настоящем описании «аффинность связывания» относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении его партнера Y можно, как правило, представить константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить рядом путей, известных в технике, включая, но без ограничения, константу равновесия диссоциации (K_D), и константу равновесия ассоциации (K_A). K_D вычисляют из отношения k_{off}/k_{on} , в то время, как K_A вычисляют из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, и k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. Определить k_{on} и k_{off} можно методами, известными специалисту в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

[00128] Используемый в настоящем описании термин «специфически связывается с» относится к способности антитела связываться с антигеном с константой диссоциации (K_d) по меньшей мере примерно 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или меньше, и/или связываться с антигеном с аффинностью по меньшей мере в два раза большей, чем его аффинность в отношении неспецифического антигена. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с меньшей аффинностью при

определении, например, иммуноанализами, BIAcore®, с прибором KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или другими анализами, известными в технике. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с константой ассоциации (K_A), которая по меньшей мере в $\log 2$, $\log 2,5$, $\log 3$, $\log 4$ или больше раз больше, чем K_A , когда молекула связывается неспецифически с другим антигеном. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с K_d 1×10^{-6} М или меньше, 1×10^{-7} М или меньше, 1×10^{-8} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-10} М или меньше, 1×10^{-11} М или меньше или 1×10^{-12} М или меньше.

[00129] В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не взаимодействуют перекрестно с другими белками в схожих условиях связывания. В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с PD-1, не взаимодействуют перекрестно с другими не-PD-1 белками. В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с большей аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с аффинностью на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше более высокой, чем с другим неродственным антигеном при измерении, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического эксклюзионного анализа. В конкретном воплощении степень связывания анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, с неродственным не-PD-1 белком, меньше на 10%, 15% или 20% связывания антитела с белком PD-1 при измерении, например, методом радиоиммуноанализа.

[00130] При использовании в настоящем описании «эпитоп» является термином, известным в технике, и относится к локализованному участку антигена, с которым может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например,

последовательные аминокислоты полипептида (линейный или последовательный эпитоп), или эпитоп может, например, получаться вместе из двух или большего числа непоследовательных участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный или непоследовательный эпитоп). В некоторых воплощениях эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить с помощью, например, ЯМР спектроскопии, исследований методом рентгеновской кристаллографии, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с распылением электронов), сканирующего анализа с олигопептидами на основе матрицы (например, ограничивающими пептидами с использованием CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования при мутагенезе (например, картирование при сайтноправленном мутагенезе). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием любого метода, известного в технике (например, Giegé R. *et al.* (1994), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt 4): 339-350; McPherson A. (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189: 1-23; Chayen NE (1997), *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 6300-6303, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кристаллы антитело:антиген можно исследовать с использованием хорошо известных методов рентгенографии и можно уточнить с использованием компьютерной программы, такой как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемой Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*,; U.S. 2004/0014194), и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997), *Meth. Enzymol.*, 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P. *et al.* (2000), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 56(Pt 10): 1316-1323, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Исследование картированием при мутагенезе можно выполнять с использованием любого метода, известно специалисту в данной области техники. См., например, Champe M. *et al.* (1995), *J.*

Biol. Chem., 270: 1388-1394; и Cunningham BC & Wells JA (1989), Science, 244: 1081-1085, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, на предмет описания методов мутагенеза, включая методы сканирования аланином при мутагенезе. CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) является технологией для представления одного или нескольких пептидов в структурно ограниченной конфигурации, с поведением функциональных миметиков комплексных белковых доменов. См., например, публикации заявок на патент США № US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1, и патент США № 7972993, полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием исследований мутагенеза сканированием аланином. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием технологии картирования эпитопов CLIPS Epitope Mapping Technology от Pepscan Therapeutics.

[001] Используемые в настоящем описании термины «Т-клеточный рецептор» и «TCR» используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, включающим CDR или переменные участки TCR. Примеры TCR включают, но без ограничения, полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR, утрачивающие трансмембранные и цитоплазматические участки, одноцепные TCR, содержащие переменные участки TCR, соединенные гибким линкером, цепи TCR, соединенные инженерированной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (включая биспецифические TCR), гибриды TCR, человеческие TCR, гуманизированные TCR, полученные рекомбинатно TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и TCR, полученные генной инженерией (например, химерные TCR, включающие химерную цепь TCR, которая включает первую часть из TCR первого вида и вторую часть из TCR второго вида).

[002] Используемые в настоящем описании термины «главный комплекс гистосовместимости» и «МНС» используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле класса I МНС и/или молекуле класса II МНС.

[003] Используемый в настоящем описании термин «комплекс пептид-МНС» относится к молекуле МНС (МНС класса I или МНС класса II) с пептидом, привязанным в узнаваемом пептидсвязывающем участке МНС.

[00131] Используемые в настоящем описании термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к терапевтическим или превентивным мерам, описанным в настоящем описании. В способах «лечения» используется введение антитела субъекту с заболеванием или расстройством или с предположением о наличии такого заболевания или расстройства для предотвращения, излечения, замедления, уменьшения тяжести или ослабления одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства или рецидивирующего заболевания или расстройства, или для того, чтобы пролонгировать продолжительность существования субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

[00132] Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» в контексте назначения терапии субъекту относится к количеству терапии, с которым достигается желательное профилактическое или терапевтическое действие.

[00133] Используемый в настоящем описании термин «субъект» включает любого человека или животное, не являющееся человеком. В предпочтительном воплощении субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком, предпочтительнее человек.

[00134] Определение «процентной идентичности» между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями) можно выполнить с использованием математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S. & Altschul SF (1990), PNAS, 87: 2264-2268, модифицированный в Karlin S. & Altschul SF (1993), PNAS, 90:

5873-5877, включенных полностью в настоящее описание в качестве ссылок. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, Altschul SF et al., (1990), J. Mol. Biol., 215: 403, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Поиск нуклеотидов в BLAST можно выполнить с набором параметров программы нуклеотидов NBLAST, например, для оценки=100, длина слова=12, и получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем описании. Поиск белков в BLAST можно выполнить с набором параметров программы XBLAST, например, для оценки 50, длина слова=3, и получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков, описанным в настоящем описании. Для того, чтобы получить выравнивания с добавлением гэпов для целей сравнения, можно использовать BLAST с добавлением гэпов, как описано в статье Altschul SF et al. (1997), Nuc. Acids Res., 25: 3389-3402, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. С другой стороны, можно использовать PSI BLAST для выполнения повторного поиска, который обнаруживает слабые соотношения между молекулами (там же). Когда используют программы BLAST, BLAST с добавлением гэпов и PSI Blast, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) во всемирной паутине, ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Маерса и Миллера, 1988, CABIOS, 4:11-17, работа полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для выравнивания последовательностей GCG. Когда программу ALIGN используют для сравнения аминокислотных последовательностей, можно использовать таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину гэта 12 и штраф за гэп 4.

[00135] Процентную идентичность между двумя последовательностями можно определить с использованием методов, схожих с методами, описанными выше, с или без учета гэпов. При

вычислении процентной идентичности типично посчитывают только точные совпадения.

5.2. Анти-PD-1 антитела

[00136] В одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Аминокислотные последовательности примеров антител приводятся в настоящем описании в таблицах 1-6.

Таблица 1. Последовательности переменных участков, CDR и FR примеров анти-PD-1 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	AGEN2033w, Кабат CDRH1	SYGMH
2	AGEN2033w, Кабат CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVKG
3	AGEN2033w, Кабат CDRH3	NVDY
4	AGEN2033w, Кабат CDRL1	RASQSVSSNLA
5	AGEN2033w, Кабат CDRL2	GASTRAT
6	AGEN2033w, Кабат CDRL3	QQYNNWPRT
7	AGEN2034w, Кабат CDRH3	NGDH
8	AGEN2033w IMGT CDRH1	GFTFSSYG
9	AGEN2033w IMGT CDRH2	IWYDGSNK
10	AGEN2033w IMGT CDRH3	ASNVDY
11	AGEN2033w IMGT CDRL1	QSVSSN
12	AGEN2033w IMGT CDRL2	GAS
13	AGEN2033w IMGT CDRL3	QQYNNWPRT
14	AGEN2034w IMGT CDRH3	ASNGDH
15	AGEN2033w, AGEN2046w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSS
16	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVE IK

17	AGEN2034w, AGEN2047w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
18	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
52	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG
19	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWPRFTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
20	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

53	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSENKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNY K TTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSLG
21	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSENKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFC SVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
54	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSENKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFC SVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
22	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSENKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAV YYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFC SVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

55	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

57	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F (без C-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFPPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E (без C-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	AGEN2001w VH (BADD426-2614)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCATNGDYWGQ GTLVTVSS
27	AGEN2002w VH (BADD426-2615)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDYWGQ GTLVTVSS
28	EP11_p11_B03 (BADD438-2743)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNEYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS

29	EP11_p11_B05 (BADD438-2745)	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWF DGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGD HWGQ GTLVTVSS
30	EP11_p11_C02 (BADD438-2746)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWI YDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGD HWGH GTLVTVSS
31	EP11_p11_C03 (BADD438-2747)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWI YDGSNKYYADSVMGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGD HWGQ GTLVTVSS
32	Консенсус CDRH2	VIWX ₁ DGSNX ₂ YYADSVX ₃ G X ₁ является Y или F; X ₂ является K или E; и X ₃ является K или M
33	Консенсус CDRH3	NX ₁ DX ₂ X ₁ является G или V; и X ₂ является H или Y
34	CDRH2	VIWYDGSNEYADSVKG
35	CDRH2	VIWFDGSNKYYADSVKG
36	CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVMG
37	CDRH3	NGDY
38	VH FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFS
39	VH FR1	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLS CAASGFTFS
40	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVA
41	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS
42	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAT
43	VH FR4	WGQGLVTVSS
44	VH FR4	WGHGTLVTVSS
45	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
46	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
47	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC
48	VL FR4	FGQGTKVEIK
49	Консенсусная последователь- ность VH	QVQLVESGGGX ₁ VQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWX ₂ DGSNX ₃ YYADSVX ₄ GR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAX ₅ NX ₆ D X ₇ WX ₈ GTLVTVSS X ₁ является V или M, X ₂ является Y или F, X ₃ является K или E, X ₄ является K или M, X ₅ является S или T, X ₆ является G или V, X ₇ является H или Y, и X ₈ является Q или H
50	IGHV3-33*01, зародышевая последователь- ность	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWI YDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR

51	IGKV3-15*01, зародышевая последователь- ность	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWP
59	Аллотип G1m3 человеческого IgG1 (без С- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
60	Аллотип G1m3 человеческого IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 N297A (без С-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
62	IgG1 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

63	IgG4 S228P (без С-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSLG
64	IgG4 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSLGK
65	Константный участок легкой цепи каппа IGKC*01, аллотип Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

Таблица 2. Последовательности CDR тяжелых цепей примеров анти-PD-1 антител¹

Антитело	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NVDY (3)
AGEN2034w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
AGEN2001w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
AGEN2002w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
EP11_pl1_B03	SYGMH (1)	VIWYDGSNEYADSVKG (34)	NGDH (7)
EP11_pl1_B05	SYGMH (1)	VIWFDGSNKYYADSVKG (35)	NGDH (7)
EP11_pl1_C02	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
EP11_pl1_C03	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVMG (36)	NGDH (7)

¹CDRs VH в таблице 2 определены по Кабат.

Таблица 3. Последовательности CDR легких цепей примеров анти-PD-1 антител²

Антитело	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2034w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2001w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2002w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B05	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C02	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)

²CDRs VL в таблице 3 определены по Кабат.

Таблица 4. Каркасные (FR) последовательности VH примеров анти-PD-1 антител³

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)
AGEN2034w	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)
AGEN2001w	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAT (42)	WGQGTLV TVSS (43)
AGEN2002w	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)
EP11_pl1_B03	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)
EP11_pl1_B05	QVQLVESGGGMVQP GRSLRLSCAASGFTF S (39)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)

EP11_p11_C02	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGHGTLV TVSS (44)
EP11_p11_C03	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTF S (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGTLV TVSS (43)

³Каркасные участки VH, описанные в таблице 4, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными словами, CDR VH определены по Кабат, и каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в переменном участке в формате FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 и FR4.

Таблица 5. Каркасные (FR) последовательности VL примеров анти-PD-1 антител⁴

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033 w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2034 w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2001 w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2002 w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_ B03	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_ B05	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_ C02	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_ C03	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQ APRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYY C (47)	FGQGTKVEIK (48)

⁴Каркасные участки VL, описанные в таблице 5, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными

словами, CDR VL определены по Кабат, и каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в варибельном участке в формате FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 и FR4.

Таблица 6. Последовательности VH и VL примеров анти-PD-1 антител

Антитело	Варибельный участок тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельный участок легкой цепи	SEQ ID NO:
AGEN2033w	BADD438-2742	15	3738	16
AGEN2034w	BADD438-2744	17	3738	16
AGEN2001w	BADD426-2614	26	3738	16
AGEN2002w	BADD426-2615	27	3738	16
EP11_pl1_B03	BADD438-2743	28	3738	16
EP11_pl1_B05	BADD438-2745	29	3738	16
EP11_pl1_C02	BADD438-2746	30	3738	16
EP11_pl1_C03	BADD438-2747	31	3738	16

Таблица 7. Примеры последовательностей PD-1

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
74	Пример зрелой последовательности PD-1	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQI KESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLK EDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSW PL
75	Эпитоп PD-1 (остатки 107-122)	SLAPKAQIKESLRAEL
76	Эпитоп PD-1 (остатки 5-22)	LDSPDRPWNPPTFSPALL
77	Эпитоп PD-1 (остатки 6-15)	DSPDRPWNPP
78	Эпитоп PD-1 (остатки 130-138)	EVPTAHPSP

79	Эпитоп PD-1 (остатки 106-113)	ISLAPKAQ
----	----------------------------------	----------

[00137] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); и/или

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E; и

X₃ является K или M; и/или

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V; и

X₂ является H или Y; и/или

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00138] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH1 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH2 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH3 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH одного из антител из таблицы 2 (например, CDR VH из одного ряда в таблице 2, например, все CDR VH из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VH, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VH антитела, представленные в таблице 4 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в таблице 4).

[00139] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL1 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL2 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL3 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL одного из антител из таблицы 3 (например, CDR VL из одного ряда в таблице 3, например, все CDR VL из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VL, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки (FR) VL антитела, представленные в таблице 5 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в таблице 5).

[00140] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E; и

X₃ является K или M;

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V; и

X₂ является Ни или Y;

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00141] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36. В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[00142] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7 и 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[00143] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; 1, 2, 7, 4, 5 и 6; 1, 2, 37, 4, 5 и 6; 1, 34, 7, 4, 5 и 6; 1, 35, 7, 4, 5 и 6 или 1, 36, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[00144] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему

(a) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); и/или

(b) CDRH2, включающий аминокислотную последовательность VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и/или

(c) CDRH3 включающий аминокислотную последовательность NVDY (SEQ ID NO: 3) или NGDH (SEQ ID NO: 7); и/или

(d) CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или

(e) CDRL2, включающий аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или

(f) CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00145] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

[00146] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно.

[00147] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7, соответственно.

[00148] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно.

[00149] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий

участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[00150] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[00151] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно схеме нумерации Хотиа, относящейся к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C. & Lesk AM, (1987), J. Mol. Biol., 196: 901-917; Al-Lazikani B. et al. (1997), J. Mol. Biol., 273: 927-948; Chothia C. et al. (1992), J. Mol. Biol., 227: 799-817; Tramontano A. et al. (1990), J. Mol. Biol., 215(1): 175-82; и патент США № 7709226, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Типично при использовании системы нумерации по Кабат петля Хотиа CDRH1 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля Хотиа CDRH2 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля Хотиа CDRH3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 95-102, в то время как петля Хотиа CDRL1 присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля Хотиа CDRL2 присутствует в аминокислотах легкой цепи 50-56, и петля Хотиа CDRL3 присутствует в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли Хотиа CDRH1 при нумерации с использованием системы нумерации по Кабат, варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли (это потому, что схема нумерации по Кабат помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A ни 35B не присутствует, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствует как 35A, так и 35B, петля заканчивается в 34).

[00152] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему CDR VL по Хотиа VL антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например,

AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа и CDR VL по Хотиа антитела, раскрытых в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1, включают один или больше CDR, в которых CDR Хотиа и Кабат имеют одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и включает комбинации CDR Хотиа и CDR Кабат.

[00153] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации IMGT, описанной в Lefranc M-P, (1999), *The Immunologist.*, 7: 132-136, и в Lefranc M-P et al. (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27: 209-212, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Согласно системе нумерации IMGT, CDRH1 находится в позициях 26-35, CDRH2 находится в позициях 51-57, CDRH3 находится в позициях 93-102, CDRL1 находится в позициях 27-32, CDRL2 находится в позициях 50-52, и CDRL3 находится в позициях 89-97. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенного по системе нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999), *цит. выше*, и в Lefranc M-P et al. (1999) *цит. выше*.

[00154] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно работе MacCallum RM et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. См. также, например, труд Martin A. «Protein

Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains», в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные методом по MacCallum RM *et al.* (1996), *цит. выше*.

[00155] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным участкам AbM, которая представляет собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Хотиа, и использована в Оксфордской программе молекулярного моделирования AbM (Oxford Molecular Group, Inc.), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные по схеме нумерации AbM.

[00156] Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 15, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

[00157] Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3,

представленные в SEQ ID NO: 17, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

[00158] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, соответственно.

[00159] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 14, 11, 12 и 13, соответственно.

[00160] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49.

[00161] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. Один или несколько участков, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRH1 и CDRH2

(например, два, три, четыре или пять таких участков), могут быть получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В одном воплощении каркас 1, каркас 2, каркас 3, CDRH1 и CDRH2 все получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NOs: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело

включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58.

[00162] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-

15. Один или несколько участков, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRL1 и CDRL2 (например, два, три, четыре или пять таких участков), могут быть получены из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15. В одном воплощении каркас 1, каркас 2, каркас 3, CDRL1 и CDRL2 все получены из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

[00163] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

16.

[00164] В некоторых воплощениях антитело включает аминокислотные последовательности переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16, соответственно. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых

легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[00165] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.

[00166] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.

[00167] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17 и 16, соответственно.

[00168] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17 и 16, соответственно.

[00169] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие

относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 26 и 16, соответственно.

[00170] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 26 и 16, соответственно.

[00171] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16, соответственно.

[00172] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16, соответственно.

[00173] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16, соответственно.

[00174] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16, соответственно.

[00175] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие

относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16, соответственно.

[00176] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16, соответственно.

[00177] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16, соответственно.

[00178] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16, соответственно.

[00179] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16, соответственно.

[00180] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16, соответственно.

[00181] Любой константный участок Ig можно использовать в

антителах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим константным участком тяжелой цепи IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₁. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₄. В некоторых воплощениях Ig (например, IgG₁) утрачивает N-соединенную гликановую группу, которая обычно присутствует в позиции N297 (согласно нумерации системы EU) в зрелых антителах IgG₁ дикого типа *in vivo*. Отсутствие гликана N297 приводит к существенной потере эффекторной функции. Устранения гликана N297 можно достигнуть с использованием любых методов, известных в технике. Например, в некоторых воплощениях устранения гликана N297 достигают мутацией остатка N297 для удаления сайта гликозилирования. Соответственно, в некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

[00182] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63, или 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с

человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

[00183] В некоторых воплощениях участки IgG антител, описанных в настоящем описании, имеют повышенную аффинность в отношении CD32B (также известного как FcγRIIB или FCGR2B), например, по сравнению с антителом с Fc-участком дикого типа, например, IgG₁ Fc. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, имеют селективно повышенную аффинность в отношении CD32B (FcγRIIB) как по сравнению с CD32A (FcγRIIA), так и CD16 (FcγRIIIA). Изменения последовательности, которые

приводят к повышенной аффинности для CD32B, известны в технике, см., например, работы Mimoto *et al.*, *Protein Engineering, Design & Selection*, 10: 589-598 (2013); Chu *et al.*, *Molecular Immunology*, 45: 3926-3933 (2008), и Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий мутацию, выбранную из группы, включающей G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены S267E и L328F, нумерованные согласно системе нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены P238D и L328E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замену P238D и замены, выбранные из группы, включающей E233D, G237D, H268D, P271G, A330R и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий G236D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий S239D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий V262E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает

константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий V264E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU.

[00184] В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG₁) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная токсичность.

[00185] В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирный участок Fc-участка (домен CH1) так, что изменяется число цистеиновых остатков в шарнирном участке (например, возрастает или снижается), как описано, например, в патенте США № 5677425, полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Число цистеиновых остатков в шарнирном участке может быть изменено для того, чтобы, например, облегчить сборку легкой и тяжелой цепей или изменить (например, повысить или снизить) устойчивость антитела.

[00186] В конкретном воплощении одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные публикации №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, например, на предмет примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*. В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его

FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для снижения времени полужизни антитела *in vivo*. В других воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В конкретном воплощении антитела могут иметь одну или несколько мутаций по аминокислотам (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или третьем (CH3) домене (остатки 341-447 человеческого IgG₁), нумерованы согласно нумерации системы EU. В конкретном воплощении константный участок IgG₁ антитела, описанного в настоящем описании, включает замену метионина (M) на тирозин (Y) в позиции 252, замену серина (S) на треонин (T) в позиции 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в позиции 256, при нумерации согласно нумерации системы EU. См. патент США № 7658921, полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. Показано, что такой тип мутантного IgG, называемого «мутант YTE», отображает время полужизни, возросшее в четыре раза по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. статью Dall'Acqua WF et al. (2006), J. Biol. Chem., 281: 23514-24, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых воплощениях антитело включает константный домен IgG, включающий одну, две, три или больше аминокислотных замен аминокислотных остатков в позициях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, нумерованных согласно нумерации системы EU.

[00187] В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG₁) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для повышения или снижения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора (например,

активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-участке антитела, которые снижают или повышают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, и методы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций Fc-рецептора антитела, которые можно осуществить для изменения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора описаны в, например, Smith P. *et al.* (2012), PNAS, 109: 6181-6186; патенте США № 6737056 и Международных публикациях №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00188] В другом воплощении одну, две или больше аминокислотных замен вводят в Fc-участок константного домена IgG для изменения функции(й) антитела. Например, одну, две или больше аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, нумерованных согласно нумерации системы EU, можно заменить другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменилась, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Такой подход описан в деталях в патентах США №№ 5624821 и 5648260, которые оба полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях делеция или инактивация (через точечную мутацию или иными способами) константного домена может ослабить связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, причем посредством этого усиливается локализация опухоли. См., например, патенты США №№ 5585097 и 8591886, каждый из которых полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки, где описаны мутации, которые делетируют или инактивируют константный домен и посредством этого усиливают локализацию опухоли. В некоторых воплощениях одна, две или больше аминокислотных замен могут быть введены в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, для удаления возможных сайтов гликозилирования в Fc-участке, которые могут ослабить связывание Fc-рецептора (см.,

например, Shields RL *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В различных воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, можно осуществить одну или несколько следующих мутаций: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и L237A; замена L234A и L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q или замена P329A, нумерация согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, может быть осуществлена мутация, выбранная из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию, при нумерации согласно нумерации системы EU.

[00189] В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с аминокислотной заменой N297Q или N297A при нумерации согласно нумерации системы EU. В одном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В другом воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, включающей L234A, L235A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях аминокислотные остатки в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, в позициях, соответствующих позициям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG₁, при нумерации согласно нумерации системы EU, не являются L, L и D, соответственно. Такой подход описан подробно в международной публикации № WO 14/108483, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении аминокислоты, соответствующие позициям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG₁, представляют собой F, E и A или A, A и A, соответственно, при нумерации согласно нумерации системы EU.

[00190] В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 433 в константном участке антитела, описанного в настоящем описании,

при нумерации согласно нумерации системы EU, могут быть заменены другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или пониженную или отмененную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Такой подход подробнее описан в патенте США № 6194551 (*Idusogie et al.*), который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных позициях 231-238 в N-концевом участке домена CH2 антитела, описанного в настоящем описании, изменены для того, чтобы посредством этого изменить способность антитела фиксировать комплемент, при нумерации согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, модифицирован для усиления способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела в отношении Fcγ-рецептора путем мутирования одной или нескольких аминокислот (например, введения аминокислотных замен) в следующих позициях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, нумерованных согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[00191] В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, включает константный участок антитела IgG₄, и серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, нумерованный согласно нумерации системы EU, заменен на пролин. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1,

причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

[00192] В некоторых воплощениях любую из мутаций или модификаций константного участка, описанных в настоящем описании, можно внести в один или два константных участка антитела, описанного в настоящем описании, имеющего два константных участка тяжелой цепи.

[00193] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и функционирует как антагонист.

[00194] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое неспецифически связывается с человеческим PD-1). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). Неограничивающие

примеры активности PD-1 могут включать передачу сигнала PD-1, связывание PD-1 с лигандом PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2), ингибирование продуцирования цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) и ингибирование пролиферации Т-клеток. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и дезактивирует, снижает или ингибирует активность PD-1. В конкретных воплощениях активность PD-1 оценивают так, как описано в примерах, см. ниже.

[00195] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00196] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование

цитокинов (например, IL-2 или IL- γ) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00197] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, и или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелиумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом) повышает продуцирование IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) в ответ на стимуляцию стафилококковым энтеротоксином А (SEA), по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной

области техники, относительно продуцирования IL-2 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00198] В некоторых воплощениях мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), стимулированные стафилококковым энтеротоксином А (SEA), в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, или одного или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелимумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом), имеют продуцирование IL-2, повышенное примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно PBMC, стимулированных только SEA без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

[00199] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование IFN γ совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-

либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00200] В некоторых воплощениях совместная культура человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, имеет продуцирование IFN γ , повышенное по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

[00201] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке

методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00202] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию стимулированных анти-CD3-антителом CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00203] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно передачи сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом

(например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

5.3. Фармацевтические композиции

[00204] Настоящее изобретение относится к композициям, включающим анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, имеющее желательную степень чистоты, в физиологически приемлемом носителе, эксципиенте или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы в используемых концентрациях являются нетоксичными для реципиентов и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин, резорцин, циклогесанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы белков с Zn) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твинTM, плюроникиTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00205] В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают эффективное количество антитела, описанного в настоящем

описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых воплощениях только антитело является активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут применяться при ингибировании активности PD-1 и лечении состояния, такого как рак или инфекционное заболевание. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включающей анти-PD-1 антитело по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для лечения рака или инфекционного заболевания.

[00206] Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные среды, неводные среды, противомикробные средства, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие вещества, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред включают растворы для инъекции хлорида натрия, Рингера, изотонические растворы декстрозы, стерильную воду для инъекции, раствор декстрозы и лактированный раствор Рингера для инъекции. Неводные парентеральные среды включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, сезамовое масло и арахисовое масло. В парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут добавляться противомикробные средства, которые включают фенолы или крезолы, ртутные препараты, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические

агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (твин™ 80). Секвестирующий или хелатирующий агент ионов металлов включает ЭДТК. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой сред и гидроксид натрия, хлороводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования рН.

[00207] Фармацевтическую композицию можно составить для любого пути введения субъекту. Конкретные пути введения включают интраназальный, пероральный, легочный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Парентеральное введение, описываемое подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией, также предполагается в настоящем описании. Препараты для инъекции можно получить в обычных формах в виде жидких растворов или суспензий, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или эмульсиях. Препараты для инъекции, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции для введения также могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачиватели или эмульгаторы, рН-буферирующие агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, как например, ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

[00208] Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные продукты, готовые для соединения с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные

суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для соединения со средой непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть или водными или неводными.

[00209] Если введение внутривенное, подходящие носители включают физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

[00210] Топические смеси, включающие антитело, получают так, как это описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или подобное и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, тинктур, паст, пенки, аэрозолей, промываний, спреев, суппозиторий, бандажей, дермальных пэччей или любых других препаратов, подходящих для топического введения.

[00211] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно получить в виде аэрозоля для топического применения, например, ингаляцией (см., например, патенты США №№ 4044120, 4414209 и 4364923, в которых описываются аэрозоли для доставки стероидов, применимых для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы, и которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Такие композиции для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде микротонкого порошка для инсуффляции одни или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы композиции будут в одном воплощении иметь диаметр менее 50 микрон, в одном воплощении менее 10 микрон.

[00212] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно получить для местного или топического применения, например, для топического применения к коже и слизистым оболочкам, например, глазам, в форме гелей, кремов и лосьонов, и для применения к глазу или для интраокулярного или интраспинального применения. Топическое введение рассматривается для трансдермальной доставки и также для введения в глаза или

слизистую оболочку или для ингаляционных терапий. Также можно вводить назальные растворы антитела одного или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

[00213] Трансдермальные пэтки, включая устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники, и могут использоваться для введения антитела. Например, такие пэтки раскрыты в патентах США №№ 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5,860,957, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00214] В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, включающая антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Его также можно восстанавливать и получать в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения антитела, описанного в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых воплощениях лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать эксципиент, который улучшает устойчивость, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, но без ограничения, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном воплощении примерно с нейтральным рН. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, дает желательную композицию. В одном воплощении полученный раствор будет распределен во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих

условиях, таких как примерно от 4°C до комнатной температуры. Восстановление такого лиофилизованного порошка водой для инъекции дает композицию для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизованный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему носителю. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определить эмпирически.

[00215] Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, и другие композиции, описанные в настоящем описании, также можно получить для направленного воздействия на определенную ткань, рецептор или другую область организма субъекта, которого лечат. Многие такие методы направленного воздействия хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие методы направленного воздействия рассматриваются в настоящем описании для применения в композициях по настоящему изобретению. Как примеры методов направленного воздействия, не являющиеся ограничивающими, см., например, патенты США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5,709,874, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, направленно воздействует на опухоль.

[00216] Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко осуществить путем фильтрации через, например, мембраны для стерильной фильтрации.

5.4. Способы применения и применения

[00217] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с использованием анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Любое заболевание или расстройство, при которых будет благоприятным ингибирование функции PD-1, можно лечить с использованием анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Анти-PD-1 антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и соответственно могут

использоваться как иммунотерапия для субъекта, больного раком. Например, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтической композицией, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). Следовательно, настоящее изобретение относится, в одном воплощении, к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для применения в способе лечения рака у субъекта и/или для применения для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и/или для применения в иммунотерапии для субъекта,

имеющего рак, и/или для применения в способе усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген. В предпочтительном воплощении рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[00218] Другие раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому и злокачественную меланому кожи или внутриглазную злокачественную меланому), рак почек (например, светлоклеточный рак), рак предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак костей, панкреатический рак, рак кожи, рак головы и шеи, рак матки, рак яичников, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, тестикулярный рак, рак фаллопиевой трубы, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, не-ходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный

лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечных лоханок, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому мозгового ствола, глиому, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные окружающей средой, включая заболевания, вызванные асбестом, эзофагеальный рак, рак печени, рефрактерные или рецидивирующие злокачественности, метастатические раковые заболевания, раковые заболевания, при которых экспрессируется PD-L1, и комбинации указанных раковых заболеваний.

[00219] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Одно воплощение относится к способам предупреждения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, предупреждаемая или подвергающаяся лечению согласно способам, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в настоящем описании. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композиция, являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композицию используют для лечения инфекционных заболеваний в комбинации с противoinфекционными корректирующими средствами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или антигельминтными). Поэтому в предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения и/или лечения инфекционного

заболевания, причем предпочтительнее антитело или фармацевтическая композиция являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту, или антитело или фармацевтическую композицию используют в комбинации с противоинфекционными корректирующими средствами.

[00220] Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызываются инфекционными агентами, включающими, но без ограничения, бактерии, паразитов, грибы, простейших и вирусы. В конкретном воплощении инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызывается вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (HSV-I), вирусом простого герпеса типа II (HSV-II), чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-сенцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, Echinovirus, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, свинки, кори, коревой краснухи, полиомиелита, натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II), и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, денге или натуральная оспа.

[00221] Бактериальные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*,

Staphylococcus viridians и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, микобактериальный риккетсиоз, микоплазмоз, нейссерии, пневмонию, болезнь, вызванную *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), болезнь, вызванную *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк, болезнь, вызванную *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактериями, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидиоз, болезнь, вызванную *S. aureus*, и болезнь легионеров.

[00222] Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызванные простейшими, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, хламидиоз и риккетсиоз.

[00223] Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные *Candida infections*, зигомикоз, *Candida* мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспоронемией, диссеминированный кандидоз, паракокцидиоидомикоз легких, аспергиллез легких, пневмонию, вызванную *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, кокцидиоидный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы параназальных синусов, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, дисхондроплазию большеберцовой кости, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, орофарингеальный кандидоз, X-сцепленную хроническую гранулематозную болезнь, эпидермофитию стоп, кандидоз кожи, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмин, споротрихоз и дерматофитию.

[00224] В некоторых воплощениях такие способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или средством, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM-1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, агонистическое анти-CD137 антитело, агонистическое анти-ICOS антитело, агонистическое анти-GITR антитело и агонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом и агонистическим анти-ICOS антителом. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании, в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом или его фармацевтической композицией, причем рак выбирают из группы, включающей рак легких (например, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), например, NSCLC первой линии), меланому (например, меланому первой линии) и рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), например, SCCHN первой линии).

[00225] В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтических композиций, и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе по настоящему изобретению, причем способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В другом

предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака. В другом воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающему (a) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В одном более предпочтительном воплощении дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку.

[00226] В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело используют в способах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой тремелимумаб, разработанный Pfizer и Medimmune. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой Probody, направленно воздействующее на CTLA-4, разработанное CytomX и Bristol-Myers Squibb.

[00227] Примеры анти-CTLA-4 антител, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в настоящем описании, раскрываются, без ограничения, в следующих патентах и заявках на патент, которые все полностью включены в настоящее описание: патент США № 6984720; патент США № 7411057; патент США № 7034121; патент США № 8697845; патент США № 8518404; публикация заявки на патент США № US 2009/0123477 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0105914 A1; публикация заявки на патент США № US 2013/0267688 A1; публикация заявки на патент США № US 2016/0145355 A1; публикация PCT № WO 2014/207064 A1 и публикация PCT № WO 2016/015675 A1.

[00228] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), такие как IDO (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Следовательно, в другом более предпочтительном воплощении дополнительным терапевтическим средством является соединение, которое направленно воздействует иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), даже предпочтительнее, ингибитор индоламин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях такое соединение выбирают из группы, включающей эпикадостат (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимод (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном воплощении соединение представляет собой эпикадостат. В другом воплощении соединение представляет собой F001287. В другом воплощении соединение представляет собой индоксимод. В другом воплощении соединение представляет собой NLG919.

[00229] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. В некоторых воплощениях вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока. Белки теплового шока (HSP) являются семейством высоко консервативных белков, обнаруженных повсеместно во всех видах. Их экспрессия может быть индуцирована в сильной степени до более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или глюкозную депривацию. По молекулярной массе классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды по пути кросс-презентации в

антигенпредставляющие клетки (АРС), такие как макрофаги и дендритные клетки (DC), приводя к Т-клеточной активации. HSP функционируют как носители шаперонов опухольассоциированных антигенных пептидов, образующих комплексы, способные индуцировать опухольспецифический иммунитет. После высвобождения из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген процессируются в пептиды, которые связывают молекулы МНС класса I и класса II, что ведет к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, выявленный комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессированных при раке у каждого субъекта. Следовательно, в другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину. В другом предпочтительном воплощении вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока, предпочтительнее противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока.

[00230] Комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) представляет собой белково-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока в нековалентном комплексе с антигенными пептидами. HSPPC выявляет как врожденные, так и приобретенные иммунные реакции. В конкретном воплощении антигенный(е) пептид(ы) отображает(ют) антигенность для рака, от которого лечат. HSPPC эффективно захватываются APC через мембранные рецепторы (главным образом CD91) или путем связывания с толл-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продуцированием хемокинов и цитокинов, ведущим к активации природных клеток-киллеров (NK), моноцитов и Th-1- и Th-2-опосредованным иммунным реакциям. В

некоторых воплощениях HSPPC, используемые в способах, раскрытых в настоящем описании, включают один или несколько белков теплового шока из семейства hsp60, hsp70 или hsp90 стрессовых белков в комплексе с антигенными пептидами. В некоторых воплощениях HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или большего их числа.

[00231] В конкретном воплощении комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) включает рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептидсвязывающие домены в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока можно получить технологией рекомбинантных ДНК, например, с использованием последовательности hsc70, как описано в Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acids Res.*, 15: 5181-5197 (1987), и GenBank, инвентарный номер P11142 и/или Y00371, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях последовательности Hsp70 такие, как описанные в работах Hunt and Morimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (19), 6455-6459 (1985), и GenBank, инвентарный номер P0DMV8 и/или M11717, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Антигенные пептиды также можно получить методами рекомбинантных ДНК, известными в технике.

[00232] В некоторых воплощениях антигенные пептиды включают модифицированную аминокислоту. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает посттрансляционную модификацию. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает имитацию посттрансляционной модификации. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи.

[00233] В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC), например,

комплексом белков теплового шока с пептидами 96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 включает белок теплового шока в 96 кДа (Hsp), gp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 является средством противораковой иммунотерапии, полученным из опухоли субъекта, и содержит антигенный «отпечаток» рака. В некоторых воплощениях такой отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в конкретных раковых клетках определенного субъекта, и предполагается, что инъекция вакцины стимулирует иммунную систему субъекта для узнавания и атаки любых клеток со специфическим раковым отпечатком. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC) для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

[00234] В некоторых воплощениях HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли типа рака, от которого лечат, или его метастаз. В другом конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, которого лечат. В некоторых воплощениях опухолевая ткань является не-некротической опухолевой тканью. В некоторых воплощениях по меньшей мере 1 грамм (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 граммов) не-некротической опухолевой ткани используют для получения режима вакцины. В некоторых воплощениях после хирургической резекции не-некротическую опухолевую ткань замораживают перед применением при получении вакцины. В некоторых воплощениях HSPPC, например, HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методами очистки, фильтруют и готовят для вакцины для инъекции. В некоторых воплощениях субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например, HSPPC-96. В таких воплощениях дозы HSPPC, например, HSPPC-96, могут вводиться еженедельно в случае первых 4 доз и затем раз в две

недели в случае дополнительных 2-8 доз.

[00235] Другие примеры NSPPC, которые можно использовать согласно способам, описанным в настоящем описании, раскрываются в следующих патентах и заявках на патент: патенты США №№ 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00236] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с адъювантом. Можно использовать различные адъюванты в зависимости от контекста лечения. Неограничивающие примеры соответствующих адъювантов включают, но без ограничения, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант от Seppic), адъювантную систему Ribi (RAS), Titer Max, мурамилпептиды, адъювантный препарат Syntex (SAF), алюмин (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты соли алюминия, адъюванты Gerbu®, антиген, абсорбированный нитроцеллюлозой, инкасулированный или захваченный антиген, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды толл-подобных рецепторов (TLR), лиганды маннансвязывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают CpG-олигонуклеотиды и молекулы двухцепочечной РНК, такие как поли(А) и поли(У). Также можно использовать комбинации вышеназванных адъювантов. См., например, патенты США №№ 6645495, 7029678 и 7858589, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В одном воплощении адъювантом, используемым в настоящем изобретении, является QS-21 STIMULON.

[00237] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим средством является растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительным

терапевтическим средством является клетка, экспрессирующая TCR. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR, для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

[00238] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых воплощениях клетка является Т-клеткой.

[00239] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с имитирующим TCR антителом. В некоторых воплощениях имитирующим TCR антителом является антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-MHC. Примеры имитирующих TCR антител, но без ограничения, см., например, в патенте США № 9074000 и публикациях заявок на патент США №№ US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00240] Анти-PD-1 антитело и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое, радиотерапевтическое, средство, направленно воздействующее на контрольную точку, ингибитор IDO, вакцину, растворимый TCR, клетку, экспрессирующую TCR, клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, и/или имитирующее TCR антитело) можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном воплощении анти-PD-1 антитело вводят парентерально, и ингибитор IDO вводят перорально.

[00241] Антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, можно доставить субъекту различными путями. Они включают, без ограничения, парентеральный, интраназальный, интратекальный, пероральный, интрадермальный, конъюнктивальный, интраартериальный и подкожный пути. Также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и препарата с образующим аэрозоль

агентом для применения в виде спрея. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интраартериально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют в лимфоузел, дренирующий опухоль.

[00242] Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от характера заболевания и может быть определено обычными клиническими методами.

[00243] Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести инфекции или заболевания, вызванного ею, и должна определяться согласно представлению лечащего врача и особенностей каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут изменяться в зависимости от способов введения, места-мишени, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств, или является лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, не являющихся людьми, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозировки оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

[00244] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, также можно использовать для анализа уровней белка PD-1 в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализов с антителами известны в технике и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза, радиоизотопы, такие как иод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S),

триций (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно использовать для мечения антитела, описанного в настоящем описании. С другой стороны, можно пометить второе антитело, которое узнает анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и использовать в комбинации с анти-PD-1 антителом для детекции уровней белка PD-1. Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для детекции *in vitro* белка человеческого PD-1 в биологическом образце. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для анализа и/или детекции уровней белка человеческого PD-1 в биологическом анализе *in vitro*, причем предпочтительно анти-PD-1 антитело конъюгировано с радионуклеидом или детектируемой меткой и/или содержит метку, описанную в настоящем описании, и/или при этом используют иммуногистологический метод.

[00245] Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка PD-1 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PD-1 в первом биологическом образце непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка) или относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида PD-1 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка PD-1, причем стандартный уровень берут из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяют путем усреднения уровня у популяции индивидуумов, не имеющих расстройства. Как будет принято в технике, так как «стандартный» уровень полипептида PD-1 известен, его можно использовать повторно как стандарт для сравнения. Следовательно, в другом воплощении настоящее изобретение относится к *in vitro* способу анализа и/или детекции уровней белка PD-1, в частности, уровней человеческого белка PD-1, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня

белка PD-1, в частности, человеческого белка PD-1, в биологическом образце иммуногистологическим методом.

[00246] Используемый в настоящем описании термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих PD-1. Методы получения биопсий тканей и жидкостей организма от животных (например, людей) хорошо известны в технике. Биологические образцы включают периферические мононуклеарные клетки крови.

[00247] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно использовать для применений при прогнозировании, диагностике, мониторинге и скрининге, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области техники, и основанные на настоящем описании. Прогностические, диагностические, контролируемые и скринирующие анализы и наборы для суждения *in vitro* и оценки статуса иммунной системы и/или иммунной реакции можно использовать для предсказания, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациента, включая пациентов, известных как имеющих или с предположением о наличии дисфункции иммунной системы, или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. Суждение и оценка статуса иммунной системы и/или иммунной реакции также применимы при определении соответствия пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения определенного химиотерапевтического средства, радиотерапевтического средства или антитела, включая их комбинации, против другого средства или антитела. Такой тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже имеется в практике с использованием антител против белка HER2 при раке молочной железы (Herceptest™, Dako), где анализ также используют для оценки пациентов для терапии антителами с использованием герцептина®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы и радиоизображение иммунных реакций.

Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в способе предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по изобретению для предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину, путем анализа и/или детекции *in vitro* уровней человеческого белка PD-1 в биологическом образце субъекта.

[00248] В одном воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать при иммуногистохимии образцов биопсии. Предпочтительно способ является методом *in vitro*. В другом воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать для детекции уровней PD-1 или уровней клеток, которые содержат PD-1 на поверхности своих мембран, и затем такие уровни можно связать с симптомами некоторых заболеваний. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, могут содержать детектируемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклеидом или детектируемой меткой. Когда используют флуоресцентные метки, можно использовать доступные в настоящее время микроскопию и анализ с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортера (FACS) или комбинацию процедур обоих методов, известных в технике, для идентификации и количественного определения участников специфического связывания. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании,

могут содержать или могут быть конъюгированы с флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционноспособные и конъюгированные зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и красители тexasский красный, Alexa Fluor, красители Cy и DyLight. Анти-PD-1 антитела могут содержать или могут быть конъюгированы с радиоактивной меткой или радионуклеидом, такими как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . Когда используют радиоактивные метки, можно использовать доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в технике, для идентификации и количественного определения специфического связывания анти-PD-1 антитела с PD-1 (например, человеческим PD-1). В случае, когда меткой является фермент, детекцию можно выполнить любыми используемыми в настоящее время колориметрическими, спектрофотометрическими, флуороспектрофотометрическими, амперометрическими или газометрическими методами, известными в технике. Этого можно достигнуть введением в контакт образца или контрольного образца с анти-PD-1 антителом в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом и PD-1. Любые комплексы, образованные между антителом и PD-1, детектируют в образце и в контроле и сравнивают. В свете специфического связывания антител для PD-1, описанных в настоящем описании, антитела можно использовать специфически для детекции экспрессии PD-1 на поверхности клеток. Антитела, описанные в настоящем описании, также можно использовать для очистки PD-1 путем иммуноаффинной очистки. В настоящее описание также включается система анализа, которую можно получить в форме набора для анализа, набора или комплекта частей для количественного анализа предела присутствия, например, для PD-1 или комплексов PD-1/лиганд PD-1. Система, набор для анализа, набор или комплект частей могут включать меченый компонент, например, меченое антитело, и один или несколько дополнительных иммунохимических реагентов.

5.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения анти-PD-1 антител

[00249] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи), которые специфически связываются с антигеном PD-1 (например, человеческим PD-1), и векторам, например, векторам, включающим такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих). Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из антител по настоящему изобретению, а также векторам, включающим такие нуклеотидные последовательности, например, экспрессирующим векторам, для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[00250] При использовании в настоящем описании «изолированный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, в организме мыши или человека) молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, «изолированная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула ДНК, может быть по существу свободна от другого клеточного материала или культуральной среды, когда получена рекомбинантными методами, или по существу свободна от химических предшественников или других химических соединений, когда синтезирована химически. Например, выражение «по существу свободный» включает препараты полинуклеотида или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющие менее примерно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее примерно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических соединений. В конкретном воплощении молекула (ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая (ие) антитело, описанное в настоящем описании, является (ются) изолированной (ыми) или очищенной (ыми).

[00251] В отдельных аспектах настоящее изобретение

относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом PD-1 (например, человеческим PD-1) и включают аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом PD-1 (например, в зависимости от дозы), или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

[00252] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем описании. Полинуклеотиды могут включать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, включающую FR и CDR VL антител, описанных в настоящем описании (см., например, таблицы 3 и 5), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, включающую FR и CDR VH антител, описанных в настоящем описании (см., например, таблицы 2 и 4).

[00253] Настоящее изобретение также относится к анти-PD-1 антителам, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодон/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и элиминации элементов неустойчивости мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-PD-1 антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH, домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем включения изменений кодона и/или элиминации ингибирующих участков в мРНК, можно осуществить путем адаптации способов, описанных в, например, патентах США №№ 5965726, 6174666, 6291664, 6414132 и 6794498, соответственно, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы неустойчивости (например, обогащенные А/Т или А/У элементы) в РНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодированных нуклеотидными последовательностями, для усиления устойчивости РНК для рекомбинантной экспрессии. Изменения используют вырождение генетического кода, например, с

использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых воплощениях может быть желательным изменение одного или нескольких кодонов для кодирования консервативной мутации, например, схожей аминокислоты со схожей химической структурой и свойствами и/или функцией как у исходной аминокислоты. Такие способы могут повысить экспрессию анти-PD-1 антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше относительно экспрессии анти-PD-1 антитела, кодированного полинуклеотидами, которые не оптимизированы.

[00254] В некоторых воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизировать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, гибридизует в условиях высокой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. В конкретном воплощении оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, гибридизует в условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации, имеется, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73), включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки.

[00255] Полинуклеотиды можно получить и определить

нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым методом, известным в технике. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в настоящем описании, например, антитела, описанные в таблицах 1-6, и модифицированные версии таких антител, можно определить с использованием методов, известных в технике, т.е., кодоны нуклеотидов, известные как кодирующие определенные аминокислоты, собирают таким образом, что получают нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al. (1994), *BioTechniques*, 17: 242-6, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки), когда, коротко, вовлекается синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование таких олигонуклеотидов и последующая амплификация лигированных олигонуклеотидов методом ПЦР.

[00256] С другой стороны, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем описании, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием методов, хорошо известных в технике (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, амплификацию ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам известной последовательности, можно выполнить с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридом, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

[00257] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту,

кодирующую определенное антитело, недоступен, но последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно синтезировать химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, созданной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли А+ РНК, выделенной из, любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, выбранные для экспрессии антитела, описанного в настоящем описании) амплификацией ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам последовательности, или клонированием с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для определенной последовательности, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует антитело. Затем полученные ПЦР амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в способные к репликации клонирующие векторы с использованием любого метода, хорошо известного в технике.

[00258] ДНК, кодирующую анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно легко изолировать и секвенировать с использованием обычных процедур (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи анти-PD-1 антител). Клетки гибридомы могут служить в качестве источника такой ДНК. После изоляции ДНК можно поместить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяев, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO от CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулин, и осуществить синтез анти-PD-1 антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00259] Для того, чтобы получить целые антитела, праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VL или VH, сайт рестрикции и фланкирующие последовательности для защиты сайта рестрикции, можно использовать для амплификации последовательностей VL или VH в клонах scFv. С использованием

методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, VH домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок тяжелой цепи, например, человеческий константный участок гамма 4, и VL домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок легкой цепи, например, человеческие константные участки каппа или лямбда. В некоторых воплощениях векторы для экспрессии VH или VL доменов включают промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для переменного участка, константные домены и маркер селекции, такой как неомидин. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, трансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG.

[00260] ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательностью для константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи мышечных последовательностей или путем ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности для полипептида неиммуноглобулина.

[00261] Изобретение также относится к полинуклеотидам, которые гибридизируют в условиях очень строгой, умеренной или более мягкой гибридизации с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящем описании. В конкретных воплощениях полинуклеотиды, описанные в настоящем описании, гибридизируют в условиях очень строгой, умеренной или более мягкой гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими VH домен и/или VL домен, раскрытые в настоящем описании.

[00262] Условия гибридизации описаны в технике и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром ДНК в 6x растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC)

при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,2×SSC/0,1% SDS при примерно 50–65°C; гибридизация в высоко строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в 6×SSC при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,1×SSC/0,2% SDS при примерно 68°C. Гибридизации в других строгих условиях известны специалистам в данной области техники и описаны, см., например, Ausubel FM *et al.*, eds. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., и John Wiley & Sons, Inc., New York, at pages 6.3.1–6.3.6 and 2.10.3, включенные полностью в настоящее описание в качестве ссылок.

[00263] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам (например, клеткам-хозяевам), экспрессирующим (например, рекомбинантно) антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), и родственным полинуклеотидам и экспрессирующим векторам. Настоящее изобретение относится к векторам (например, экспрессирующим векторам), включающим полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-PD-1 антитела или фрагменты, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим такие векторы для рекомбинантной экспрессии анти-PD-1 антител, описанных в настоящем описании (например, человеческого или гуманизированного антитела). Отдельный аспект относится к способам получения антитела, описанного в настоящем описании, включающим экспрессию такого антитела в клетке-хозяине.

[00264] Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящем описании (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепного антитела, описанного в настоящем описании), которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включает конструирование вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. Как только

полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, переменные участки тяжелой и/или легкой цепи), описанные в настоящем описании, получен, можно получать вектор для продуцирования молекулы антитела по технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов, известных в технике. Таким образом, в настоящем описании описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или фрагмент антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи), кодирующего нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующих последовательностей и соответствующих сигналов контроля транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методы рекомбинантных ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Изобретение также относится к реплицируемым векторам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящем описании, тяжелую или легкую цепь антитела, переменный участок тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, операбельно соединенный с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок молекулы антитела (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок), и переменные участки антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии полной тяжелой, полной легкой цепи или как полной тяжелой, так и полной легкой цепи.

[00265] Экспрессирующий вектор можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и затем полученные клетки можно культивировать обычными методами и получить антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Таким образом, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотид, кодирующий антитело,

описанное в настоящем описании, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь или их фрагменты или одноцепное антитело, описанное в настоящем описании, операбельно связанное с промотором, для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых воплощениях для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи, по отдельности могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, что подробно описано ниже. В некоторых воплощениях клетка-хозяин содержит вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую, так и легкую цепь антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В конкретных воплощениях клетка-хозяин содержит два различных вектора, причем первый вектор включает полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и второй вектор включает полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В других воплощениях первая клетка-хозяин включает первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и вторая клетка-хозяин включает второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании. В конкретных воплощениях тяжелая цепь/переменный участок тяжелой цепи, экспрессированные первой клеткой, ассоциируются с легкой цепью/переменным участком легкой цепи второй клетки с образованием анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании. Некоторые воплощения относятся к популяции клеток-хозяев, включающей такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[00266] Отдельное воплощение относится к популяции векторов, включающих первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменный участок легкой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, и второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/переменный

участок тяжелой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании.

[00267] Ряд систем хозяин-экспрессирующий вектор можно использовать для экспрессии молекул антител, описанных в настоящем описании (см., например, патент США № 5807715, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки). Такие системы хозяин-экспрессирующий вектор представляют собой среды, с помощью которых можно получить и затем очистить интересующие кодирующие последовательности, но также представляют собой клетки, которые могут, когда трансформированы или трансфицированы соответствующими нуклеотидными последовательностями, экспрессировать *in situ* молекулы антитела, описанного в настоящем описании. Они включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток растений (например, зеленых водорослей, таких как (*Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты CaMV; вирусом мозаики табака TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, плазмидой Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающего (например, металлотионеиновый промотор) или из

вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор 7,5К вируса коровьей оспы). В конкретном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются клетки CHO, например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza). В отдельном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном воплощении экспрессирующим вектором млекопитающего является pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В отдельном воплощении для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела используют бактериальные клетки, такие как клетки *Escherichia coli*, или эукариотные клетки (например, клетки млекопитающего), особенно для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающего, такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO), в конъюгации с вектором, таким как главный промежуточный элемент раннего генного промотора из цитомегаловируса у человека, является эффективной экспрессирующей системой для антител (Foeking MK & Hofstetter H. (1986), *Gene* 45: 101-5; и Cockett MI *et al.* (1990), *Biotechnology*, 8(7): 662-7, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном воплощении экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связывают PD-1 (например, человеческий PD-1), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

[00268] В бактериальных системах число экспрессирующих векторов может быть выгодно выбрано в зависимости от применения, предназначенного для молекулы антитела, которое экспрессируется. Например, когда следует получить большое количество такого антитела для получения фармацевтической композиции с молекулами антитела, могут быть желательны векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитых белков, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но без ограничения,

экспрессирующий вектор *E. coli* pUR278 (Ruether U. & Mueller-Hill B. (1983), EMBO J., 2: 1791-1794), в который кодирующая антитело последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с lac Z кодирующим участком, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M. (1985), Nuc. Acids Res., 13: 3101-3109; Van Heeke G. & Schuster SM (1989), J. Biol. Chem., 24: 5503-5509); и т.п., и все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем абсорбции и связывания с гранулами глутатион-агарозной матрицы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX создают для включения сайтов расщепления протеаз тромбина или фактора Ха, так что клонированный генный продукт-мишень может высвобождаться из частицы GST.

[00269] В системе насекомых вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV), например, можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую антитело последовательность можно клонировать отдельно в несущественные участки (например, ген полэдрина) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, полиэдринового промотора).

[00270] В клетках-хозяевых млекопитающих можно использовать ряд экспрессирующих систем на основе вирусов. В случаях, когда используют аденовирус в качестве экспрессирующего вектора, интересующую кодирующую антитело последовательность можно лигировать с аденовирусным комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором, и трехчастной лидерной последовательностью. Затем такой химерный ген можно встроить в геном аденовируса рекомбинацией *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественный участок вирусного генома (например, участок E1 или E3) приведет к рекомбинантному вирусу, который является жизнеспособным и способным к экспрессии

молекулы антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J. & Shenk T. (1984), PNAS, 81(12): 3655-9, включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки). Для эффективной трансляции встроенных кодирующих антитело последовательностей также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для гарантии трансляции полной вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут быть разного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии можно усилить путем инклюзии соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G. et al. (1987), Methods Enzymol., 153: 516-544, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00271] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенного желательного типа. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функции белка. Охарактеризованы различные клетки-хозяева и специфические механизмы посттрансляционного процессирования и модификации белков и генных продуктов. Соответствующие клеточные линии или системы хозяев можно выбрать для гарантии правильной модификации и процессинга чужеродных экспрессированных белков. С этой целью можно использовать эукариотные клетки-хозяев, которые обладают клеточной механикой для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но без ограничения, клетки CHO, VERO, ВНК, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W,

L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, продуцируются в клетках млекопитающего, таких как клетки CHO.

[00272] В конкретном воплощении антитела, описанные в настоящем описании, имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела можно получить с использованием методов, известных специалистам в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обеих аллелей α -1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы.

[00273] Можно получить клетки, устойчиво экспрессирующие рекомбинантные белки с высоким выходом в течение длительного времени. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые устойчиво экспрессируют анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании. В конкретных воплощениях клетка по настоящему изобретению устойчиво экспрессирует легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи, которые ассоциируются с образованием антитела, описанного в настоящем описании.

[00274] В некоторых аспектах клетки-хозяева можно трансформировать не с использованием экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные ориджины репликации, а с помощью ДНК, регулируемой соответствующими контролирующими экспрессию элементами (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить для роста в течение 1-2 дней в обогащенных средах и затем перевести в селективные среды. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает сопротивление селекции и позволяет клеткам устойчиво интегрировать плазмиду в их

хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать в клеточные линии. Такой метод можно выгодно использовать для инжиниринга клеточных линий, которые экспрессируют анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии можно использовать особенно при скрининге и оценке композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой антитела.

[00275] Можно использовать ряд систем селекции, включая, но без ограничения, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al. (1977), Cell, 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы (Szybalska EH & Szybalski W. (1962), PNAS, 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорилрибозил-трансферазы (Lowy I. et al. (1980), Cell, 22(3): 817-23) в tk-, hgp^rt- или ap^rt-клетках, соответственно, все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Также устойчивость к антиметаболитам можно использовать как основу селекции для следующих генов: *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. (1980), PNAS, 77(6): 3567-70; O'Hare K. et al. (1981), PNAS, 78: 1527-31); *gpt*, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P. (1981), PNAS, 78(4): 2072-6); *neo*, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991), Biotherapy, 3: 87-95; Tolstoshev P. (1993), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596; Mulligan RC (1993), Science, 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993), Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993), Trends Biotechnol., 11(5): 211-5); и *hygro*, который придает устойчивость к гидромицину (Santerre RF et al. (1984), Gene, 30(1-3): 147-56), все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Можно по традиции применить методы, обычно известных в технологии рекомбинантных ДНК для селекции желательного рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в Ausubel FM et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M.,

Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в Chapters 12 and 13, Dracopoli NC et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F. et al. (1981), J. Mol. Biol., 150: 1-14, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

[00276] Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить путем амплификации вектора (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, можно амплифицировать, возрастание уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет повышать число копий маркерного гена. Так как амплифицированный участок ассоциируется с геном антитела, продуцирование антитела также будет повышаться (Crouse GF et al. (1983), Mol. Cell. Biol., 3: 257-66, статья полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[00277] Клетку-хозяина можно котрансфицировать двумя или больше экспрессирующими векторами, описанными в настоящем описании, причем первый вектор кодирует тяжелую цепь, происходящую из пептида, и второй вектор кодирует легкую цепь, происходящую из пептида. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые дают возможность равной экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно котрансфицировать различными количествами двух или больше экспрессирующих векторов. Например, клетки-хозяева можно котрансфицировать при любом соотношении первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора из следующих: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[00278] С другой стороны, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна размещаться прежде тяжелой цепи для того, чтобы избежать избытка

токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986), *Nature*, 322: 562-565; и Köhler G. (1980), *PNAS*, 77: 2197-2199, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кодированные последовательности для тяжелых и легких цепей могут включать кДНК или геномную ДНК. Экспрессирующий вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше или в интервале 2-5, 5-10 или 10-20 генных/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может включать, в следующем порядке, промотор, первый ген (например, тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании) и второй ген (например, легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании). В таком экспрессирующем векторе транскрипция обоих генов может управляться промотором, в то время как трансляция мРНК из первого гена может управляться кэп-зависимым сканирующим механизмом, и трансляция мРНК из второго гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма, например, с помощью IRES.

[00279] Как только молекула антитела, описанного в настоящем описании, получена рекомбинантной экспрессией, ее можно очистить любым методом, известным в технике для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в особенности аффинной для специфического антигена после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференцирующим растворением, или любым другим стандартным методом очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, можно слить с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем описании, или иначе, что известно в технике для облегчения очистки.

[00280] В конкретных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, изолируют или очищают. Как правило, изолированное антитело является антителом, которое по существу свободно от других антител с иной антигенной специфичностью, чем изолированное антитело. Например, в отдельном воплощении

препарат антитела, описанного в настоящем описании, по существу свободен от клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение «по существу свободен от клеточного материала» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых его выделили, или в которых получили рекомбинантно. Таким образом, антитело, которое по существу свободно от клеточного материала, включает препараты антитела, имеющие менее примерно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (на сухую массу) гетерологичного белка (также называемого в настоящем описании «загрязняющим белком») и/или вариантов антитела, например, различных посттрансляционных модифицированных форм антитела, или других версий антитела (например, фрагментов антитела). Когда антитело получено рекомбинантно, оно также, как правило, по существу свободно от культуральной среды, т.е., культуральная среда представляет менее примерно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема белкового препарата. Когда антитело получено химическим синтезом, оно, как правило, по существу свободно от химических предшественников или других химических веществ, т.е., оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвовали в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее примерно 30%, 20%, 10% или 5% (на сухую массу) химических предшественников или соединений иных, чем интересующее антитело. В конкретном воплощении антитела, описанные в настоящем описании, являются изолированными или очищенными.

[00281] Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить любым способом, известным в технике для синтеза антител, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящем описании, используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, методологии, генетического анализа, рекомбинантных ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и областей, родственных данной области техники. Такие методы описаны,

например, в ссылках, цитированных в настоящем описании, и в полной мере объяснены в литературе. См., например, Maniatis T. *et al.* (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. *et al.* (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 ежегодные новости); Gait (ed.) (1984), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999); *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок.

[00282] В конкретном воплощении антитела, описанное в настоящем описании (например, рекомбинантное антитело), получают, экспрессируют, создают или очищают любыми способами, которые включают создание, например, через синтез, последовательностей ДНК методами генной инженерии. В некоторых воплощениях такое антитело включает последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в зародышевом репертуаре антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

[00283] Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании. Некоторый аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании (например, клетки

или клетки-хозяина, включающих полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем описании). В отдельном воплощении клетка является изолированной клеткой. В отдельном воплощении способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[00284] Способы получения поликлональных антител известны в технике (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00285] Моноклональные антитела можно получить с использованием широкого ряда методов, известных в технике, включающих использование гибридом, рекомбинатов, и методы фагового дисплея, или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с использованием методов гибридом, включая методы, известные в технике, и описанные, например, в Harlow E & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563, 681 (Elsevier, N.Y., 1981), полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, не ограничивается антителами, полученными технологией гибридом. Например, моноклональные антитела можно получить рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

[00286] В конкретном воплощении «моноклональное антитело» при использовании в настоящем описании является антителом, продуцированным одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем антитело специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) при определении ELISA или другим анализом связывания антигена или конкурентного связывания, известным в технике, или описанным в примерах в настоящем описании. В отдельных воплощениях моноклональное антитело может являться химерным

антителом или гуманизированным антителом. В некоторых воплощениях моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В отдельных воплощениях моноклональное антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом). Моноклональные антитела, описанные в настоящем описании, можно, например, получить методом гибридом, описанным в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256: 495, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки, или можно, например, выделить из фаговых библиотек с использованием методов, описанных в настоящем описании, например. В технике хорошо известны другие способы получения клонированных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных посредством их (см., главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM et al., цит. выше).

[00287] Способы получения и скрининга специфических антител с использованием технологии гибридом являются рутинными и хорошо известны в технике. Например, в методе гибридом мышь или другое соответствующее животное-хозяина, такое как овца, коза, кролик, хомячок или обезьяна, иммунизируют для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), используемым для иммунизации. С другой стороны, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Кроме того, для иммунизации животного можно использовать метод RIMMS (несколько мест повторной иммунизации) (Kilpatrick KE et al. (1997), *Hybridoma*, 16: 381-9, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[00288] В некоторых воплощениях мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомячки или

собаки) можно иммунизировать антигеном (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), и как только иммунную реакцию детектируют, например, антитела, специфические для антигена, детектируют в мышинной сыворотке, селезенку мыши собирают, и изолируют спленоциты. Затем спленоциты сливают хорошо известными методами с какими-либо подходящими миеломными клетками, например, клетками из клеточной линии SP20, доступной от Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Маннассас, Виргиния), с образованием гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют методом предельного разведения. В некоторых воплощениях собирают лимфоузлы иммунизированных мышей и сливают с миеломными клетками NS0.

[00289] Затем полученные клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы утрачивают фермент гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазу (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом типично будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

[00290] В конкретных воплощениях используют миеломные клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают устойчивое на высоком уровне продуцирование антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. К числу таких клеточных линий относятся клетки миеломы мышей, такие как клеточная линия NS0, или клетки, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные от Американской коллекции типовых культур, MD, USA. Описаны также клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломные клетки мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D. (1984), J. Immunol., 133: 3001-5; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), полностью включены в настоящее

описание в качестве ссылок).

[00291] Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают на продуцирование моноклональных антител, направленных против PD-1 (например, человеческого PD-1). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных клетками гибридомы, определяют методами, известными в технике, например, иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00292] После того, как идентифицированы клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желательной специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать процедурами предельного разведения и выращивать стандартными методами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, цит. выше). Подходящие культуральные среды для такой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* как асцитические опухоли у животного.

[00293] Моноклональные антитела, секретированные субклонами, соответственно отделяют от культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки обычными процедурами очистки иммуноглобулина, такими как, например, хроматография на белок А-сефарозе, гидроксилпатите, гельэлектрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[00294] Антитела, описанные в настоящем описании, включают фрагменты антитела, которые узнают специфический PD-1 (например, человеческий PD-1), и могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂, описанные в настоящем описании, можно получить протеолитическим расщеплением молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плечей молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два

антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, соединенных дисульфидными связями в шарнирном участке.

[00295] Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, также можно получить с использованием различных методов фагового дисплея, известных в технике. В методах фагового дисплея функциональные домены антитела отображаются на поверхности фаговых частиц, которые содержат полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческих и мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv ПЦР и клонируют в фагемидный вектор. Вектор подвергают электропорации в *E. coli*, и *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаги, используемые в таких методах, типично являются нитчатými фагами, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с фаговым геном III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с определенным антигеном, можно отобрать или идентифицировать с помощью антигена, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного с или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в настоящем описании, включают методы, раскрытые в Brinkman U. et al. (1995), J. Immunol. Methods, 182: 41-50; Ames RS et al. (1995), J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough CA et al. (1994), Eur. J. Immunol., 24: 952-958; Persic L. et al. (1997), Gene, 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994), Advan. Immunol., 57: 191-280; заявке РСТ № РСТ/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00296] Как описано в указанных выше ссылках, после селекции фага можно изолировать антителокодирующие участки из

фрага и использовать для получения целых антител, включая человеческие антитела, или любой другой желательный антигенсвязывающий фрагмент и экспрессировать в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, описанные ниже. Методы рекомбинантного продуцирования фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, также можно использовать с использованием методов, известных в технике, таких как методы, описанные в публикации PCT № WO 92/22324; в Mullinax RL *et al.* (1992), *BioTechniques*, 12(6): 864-9; Sawai H. *et al.* (1995), *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34; и в Better M. *et al.* (1988), *Science*, 240: 1041-1043, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00297] В некоторых воплощениях для получения целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, например, клонов scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные VH домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VH участок, и ПЦР-амплифицированные VL домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VL участок например, человеческие константные участки каппа или лямбда. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи котрансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

[00298] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела происходят из различных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменный участок мышиного или крысиного антитела, слитый с

константным участком человеческого антитела. Методы получения химерных антител известны в технике. См., например, Morrison SL (1985), *Science*, 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986), *BioTechniques*, 4: 214-221; Gillies SD *et al.* (1989), *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202; и патенты США №№ 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00299] Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и включает каркасный участок, имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и CDR, имеющие по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышинового иммуноглобулина). В отдельных воплощениях гуманизированное антитело также включает по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), типично константного участка человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнир, участки CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело можно выбрать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела можно получить с использованием ряда методов, известных в технике, включая, но без ограничения, CDR-прививку (Европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), вениринг или изменение поверхности (Европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991), *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.* (1994), *Prot. Engineering*, 7(6): 805-814; и Roguska MA *et al.* (1994), *PNAS*, 91: 969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332), и методы, описанные, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P. *et al.* (2002), *J. Immunol.*, 169: 1119-25; Caldas C. *et al.* (2000), *Protein Eng.*, 13(5): 353-60; Morea V. *et al.* (2000), *Methods*, 20(3): 267-79; Baca M. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.* (1996), *Protein Eng.*, 9(10): 895-904; Couto JR *et al.* (1995), *Cancer Res.*, 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.* (1995), *Cancer*

Res., 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994), Gene 150(2): 409-10, и Pedersen JT et al. (1994), J. Mol. Biol., 235(3): 959-73, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февр. 2005), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[00300] Описаны методы получения мультиспецифических (например, биспецифических) антител, см., например, патенты США №№ 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 и 8586713, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00301] Однодоменные антитела, например, антитела, лишенные легких цепей, можно получить методами, хорошо известными в технике. См. Riechmann L. & Muyldermans S. (1999). J. Immunol., 231: 25-38; Nuttall SD et al. (2000), Curr. Pharm. Biotechnol., 1(3): 253-263; Muyldermans S. (2001), J. Biotechnol., 74(4): 277-302; патент США № 6005079; и международные публикации №№ WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00302] Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном PD-1, можно, в свою очередь, использовать для получения антиидиотипических антител, которые «имитируют» антиген, с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan NS & Vona CA (1989), FASEB J., 7(5): 437-444; и Nissinoff A. (1991), J. Immunol., 147(8): 2429-2438, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00303] В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое связывается с тем же эпитопом PD-1 (например, человеческого PD-1), что и анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, является человеческим антителом. В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое конкурентно блокирует (например, в зависимости от дозы) любое из антител, описанных в настоящем описании, от связывания с PD-1 (например, человеческим PD-1), является человеческим антителом. Человеческие антитела можно получить с

использованием любого метода, известного в технике. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. В частности, комплексы генов человеческих тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина можно ввести случайно или путем гомологичной рекомбинации. С другой стороны, в эмбриональные стволовые клетки мыши, кроме генов человеческих тяжелой и легкой цепи, можно ввести человеческий варибельный участок, константный участок и дополнительный участок. Гены мышинных тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина могут быть представлены нефункциональными отдельно или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция участка J_H предотвращает продуцирование эндогенных антител. Выращивают модифицированные эмбриональные стволовые клетки и инъецируют в бластоциты, и получают химерных мышей. Затем химерных мышей размножают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела. Трансгенных мышей обычным образом иммунизируют выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, PD-1). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, укрытые трансгенными мышами, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и затем претерпевают переключение класса и соматическую мутацию. Таким образом, с использованием такого метода возможно получить терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор такой технологии для получения человеческих антител см. в Lonberg N. & Huszar D. (1995), *Int. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Подробное раскрытие такой технологии для получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколы получения таких антител см., например, в международных публикациях №№ WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806,

5814318 и 5939598, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США №№ 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США №№ 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin), где все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00304] Человеческие антитела, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить рядом методов, известных в технике, включая методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации №№ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00305] В некоторых воплощениях человеческие антитела можно получить с использованием гибридом мышь-человек. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), можно слить с клетками миеломы мыши и получить гибридомы мышь-человек, секретирующие человеческие моноклональные антитела, и такие гибридомы мышь-человек можно скринировать для определения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном-мишенью (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)). Такие методы известны и описаны в технике, см., например, Shinmoto H. *et al.* (2004), *Cytotechnology*, 46: 19-23; Naganawa Y. *et al.* (2005), *Human Antibodies*, 14: 27-31, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

5.6. Наборы

[00306] Изобретение также относится к наборам, включающим одно или несколько антител, описанных в настоящем описании, или

их фармацевтические композиции или конъюгаты. Конкретное воплощение относится к фармацевтической упаковке или набору, включающим один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании, такими как одно или несколько антител, описанных в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (РНА) и/или форболмиристатацетат (РМА), или антитело, стимулирующее TCR-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Необязательно в ассоциации с таким(и) контейнером(ами) может находиться уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в котором отражено одобрение учреждением изготовления, применения или продажи для назначения человеку.

[00307] Изобретение также относится к наборам, которые можно использовать в описанных выше методах. В одном воплощении набор включает антитело, описанное в настоящем описании, предпочтительно очищенное антитело, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат по существу изолированный антиген PD-1 (например, человеческий PD-1) как контроль. В другом конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат контрольное антитело, которое не взаимодействует с антигеном PD-1. В другом конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат один или несколько элементов для детекции связывания антитела с антигеном PD-1 (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое узнает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В конкретных

воплощениях набор, описанный в настоящем описании, может включать антиген PD-1, полученный рекомбинантно или синтезированный химически. Антиген PD-1, представленный в наборе, также может быть присоединен к твердой основе. В более конкретном воплощении средство для детекции в вышеописанном наборе включает твердую подложку, к которой присоединен антиген PD-1. Такой набор также может включать неприсоединенное репортерное меченное античеловеческое антитело или антимышиное/крысиное антитело. В таком воплощении связывание антитела с антигеном PD-1 можно обнаружить путем связывания указанного репортерного меченого антитела. В одном воплощении настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для *in vitro* анализа и/или детекции антигена PD-1 (например, человеческого PD-1) в биологическом образце.

6. ПРИМЕРЫ

[00308] Примеры в данном разделе (т.е., разделе 6) предлагаются для пояснения, но не для ограничения изобретения.

6.1. Пример 1. Характеризация анти-PD-1 антител

[00309] В этом примере описывается характеристика антител, которые специфически связываются с человеческим PD-1, в частности, антитела, обозначенные AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w. AGEN2033w и AGEN2046w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15) и одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2034w и AGEN2047w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 17) и одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2033w и AGEN2034w являются человеческими антителами IgG₄, содержащими мутацию S228P (т.е., замену серина на пролин в позиции 228 относительно константного участка IgG₄ дикого типа), согласно нумерации системы EU, в то время как AGEN2046w и AGEN2047w являются человеческими антителами IgG₁. Кроме того, также характеризуются три мутанта Fc AGEN2047w: мутант N297A, двойной

мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU.

6.1.1. Антитела, связывающиеся с PD-1, экспрессированным активированными Т-клетками

[00310] Анти-PD-1 антитела AGEN2046w, AGEN2047w и AGEN2034w проверяют на связывание с активированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMCs) методом проточной цитометрии. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, каталожный номер (кат.№) 002), или криоконсервированные PBMC яванского макака (Worldwide Primates Inc., по заказу) высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNCLON delta (NUNC™). Клетки культивируют в присутствии 100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина А (SEA; для человеческих PBMC) (Toxin Technologies, кат.№ at101red) или стафилококкового энтеротоксина В (SEB; для PBMC яванского макака) (Toxin Technology, кат.№ bt202red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Затем клетки промывают один раз буфером для образца (PBS+2% FBS+0,09% азиды натрия) и инкубируют в темноте на льду со 100 мкл серийно разведенных антител или изотипических контролей (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл AGEN2046w, AGEN2047w или изотипического контрольного человеческого IgG₁ (LifeTein LLC, кат.№ LT12031); или 25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0,008, 0,0016, 0,00032 и 0,000064 мкг/мл AGEN2034w или изотипического контрольного человеческого IgG₄ (LifeTein LLC, кат.№ LT12034)). Через 45 минут клетки дважды промывают буфером для образца и затем инкубируют с красителем для мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life Technologies, кат.№ L10119), CD4-BV421 (Biolegend, кат.№ 317434) и козьим F(ab')₂ античеловеческим IgG+A+M, R-PE (Life Technologies, кат.№ ANI1707) в течение 30 минут. Клетки дважды промывают буфером для образца и затем ресуспендируют в буфере для образца и анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton

Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00311] Анти-PD-1 антитела AGEN2046w и AGEN2047w связывают с активированными человеческими CD4+ Т-клетками (фигура 1A). AGEN2034w связывают с активированными CD4+ Т-клетками человека и яванского макака (фигуры 1B и 1C).

[00312] Связывание AGEN2034w с активированными первичными человеческими Т-клетками измеряют снова в подобном анализе. Коротко, человеческие PBMC культивируют в присутствии 100 нг/мл пептида SEA в течение 5 суток и затем окрашивают серийно разведенным (50, 10, 2, 0,4, 0,080, 0,016, 0,0032, 0,00064, 0,000128, 0,0000256, 0,00000512 и 0,000001024 мкг/мл) AGEN2034w или изотипическим контрольным человеческим IgG₄. Клетки анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00313] Как видно на фигуре 1D, AGEN2034w связывается с активированными первичными человеческими CD4+ Т-клетками.

6.1.2. Анализ на селективность антитела против PD-1

[00314] Селективность AGEN2034w в отношении PD-1 оценивают против гомологичных белков с использованием технологии «suspension array».

[00315] На основании гомологии их аминокислотных последовательностей с PD-1, отбирают белки суперсемейства Ig кольцевой гомолог 2 (ROBO2), B7 гомолог 7 (B7-H7) и сигнальный регуляторный белок гамма (SIRPγ) для оценки связывания AGEN2034w с использованием технологии «suspension array». ROBO2, B7-H7 и SIRPγ идентифицируют как гомологи PD-1, выравнивая белки с применением средства поиска Basic Local Alignment (BLAST; NCBI). Гомология последовательностей человеческого PD-1 с его гомологами следующая: человеческого PD-1 против (vs) человеческого ROBO2: 27,9%; человеческого PD-1 vs человеческого SIRPγ (SIRPG_HUMAN): 24,8%; и человеческого PD-1 vs человеческого B7-H7: 22,6%.

[00316] Рекомбинантные белки химера человеческий ROBO2-Fc

(R&D Systems, кат.№ 3147-RB-050), химера человеческий B7-H7-Fc (R&D Systems, кат.№ 8084-B7-050), химера человеческий SIRP γ -His (Sino Biologicals, кат.№ 11828-H08H) и химера человеческий PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) вводят в сочетание с микросферами Luminox® (Luminox Corp., кат.№ LC10005-01, LC10022-01, LC10046-01, LC10048-01 и LC10059-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисукцинимиды (NHS) и инкубируют с титрованием дозы (7,5, 2,5, 0,833, 0,277, 0,0926, 0,0309, 0,0103, 0,0034, 0,0011, 0,0004, 0,0001 и 0,00004 мкг/мл) AGEN2034w. Затем для детекции AGEN2034w добавляют антитело античеловеческий IgG, меченный фикоэритрином (PE). Связывание оценивают с помощью системы детекции Luminox® 200.

[00317] Антитело AGEN2034w показывает специфическое связывание с человеческим PD-1 и в испытываемых концентрациях не обнаруживают существенного связывания с ROBO2, B7-H7 или SIRP γ (фигура 2).

6.1.3. Лигандблокирующая активность, определенная с помощью технологии «suspension array»

[00318] Для того, чтобы определить, блокируют ли анти-PD-1 антитела связывание лигандов PD-L1 и PD-L2, проводят вышеописанный анализ с использованием технологии suspension array. В каждую лунку на половине площади 96-луночных планшетов (Corning, Inc., кат.№ 3884) добавляют 1200 гранул Luminox® в 5 мкл буфера для анализа (Luminox Corp, кат.№ 48 LC10014-48). Гранулы соединяют с химерой антигена PD-1 PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) через аминокислотное сочетание с COOH на поверхности гранул. Реакцию сочетания выполняют с использованием 50 мкг/мл антигена PD-1 и 1×10^7 гранул Luminox на мл. Используют стандартную химию сложных эфиров NHS для образования карбодимидных связей между первичными аминогруппами антигена и карбоксильными группами на поверхности гранул (Luminox Xmap cookbook, chapter 3).

[00319] Сочетание антигена с белками является простой двухстадийной процедурой для образования карбодимидных связей, во время которой карбоксильные группы микросфер сначала

активируются реагентом EDC (гидрохлорид 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимида) в присутствии сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) с образованием промежуточного сложного сульфо-NHS-эфира. Затем реакционноспособное промежуточное соединение восстанавливают путем взаимодействия с первичным амином молекулы-мишени (антитела, белка или пептида) с образованием ковалентной амидной связи. Гранулы для сочетания инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при трехкратном повторе (конечные концентрации от 7,5 мкг/мл до 0,01 мкг/мл на лунку) в течение 1 часа при 20°C и 650 об/мин. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w, изотипический контроль IgG₁ и изотипический контроль IgG₄. Затем в каждую лунку добавляют 30 мкл меченого R-PE PD-L1-Fc (системы R&D, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (системы R&D, кат.№ 1224-PL) в концентрации 1 нМ, получая общий объем в лунке 60 мкл (1200 гранул на лунку и конечная концентрация 0,5 нМ меченого PD-L1 или PD-L2). Мечение лиганда проводят с использованием наборов для мечения R-PE (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, кат.№ LNK023RPE) согласно протоколу изготовителя. Планшеты анализируют с использованием системы Luminox® 200 (Millipore). Насчитывают 100 гранул на лунку в образце 50 мкл. Лигандблокирующий потенциал вычисляют с использованием величин MFI неконкурирующего сигнала (100% связывание) только контрольного лиганда. Детектируемый сигнал PE показывает связывание лиганда с антигеном.

[00320] Все испытываемые анти-PD-1 антитела ингибируют связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 (фигуры 3A-3D).

[00321] Измерение лигандблокирующей активности AGEN2034w повторяют в подобном анализе. Коротко, рекомбинантную химеру PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) сочетают с микросферами Luminox® (Luminox Corp, Кат.№ LC10048-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисулцинимид (NHS). Гранулы с присоединенным PD-1 инкубируют с титрованием дозы ($4,0 \times 10^{-5}$ -7,5 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела с последующей инкубацией флуоресцентно меченого PD-L1-Fc (R&D

Systems, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (R&D Systems, кат.№ 1224-PL). Затем оценивают связывание PD-L1 или PD-L2 с гранулами с присоединенным PD-1 с использованием системы детекции Luminex® 200, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00322] Антитело AGEN2034w эффективно блокирует сцепление PD-1 с его лигандами PD-L1 (фигура 3E) и PD-L2 (фигура 3F).

6.1.4. Действие анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA)

[00323] Функциональную активность анти-PD-1 антител на первичных человеческих Т-клетках оценивают с использованием стимуляции SEA. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNCLON delta (NUNC™). Клетки культивируют в присутствии фиксированной концентрации (10 мкг/мл) или дозовых количеств антител (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016 и 0,0032 мкг/мл) и фиксированного количества SEA (100 нг/мл, Toxin Technology, кат.№ at101red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипический контроль IgG₁. Супернатант собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00324] Как видно на фигурах 4A и 4B, анти-PD-1 антитела AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w повышают продуцирование IL-2 PBMC относительно изотипического контроля при наличии стимуляции SEA.

[00325] Далее, проверяют антагонистическую активность AGEN2034w или одного или в комбинации с анти-CTLA-4, анти-TIGIT, анти-CD137 или анти-OX40 антителами в анализе первичных PBMC, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), культивируют с суперантигеном SEA (Toxin

Technology, кат.№ at101red) (100 нг/мл на фигурах 4C, 4D и 4F; 200 нг/мл на фигуре 4E) и AGEN2034w (10 мкг/мл на фигурах 4C и 4E; 5 мкг/мл на фигуре 4D; интервал дозы 12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл на фигуре 4F) или изотипическим контрольным антителом в присутствии 5 мкг/мл анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (Myoderm) (фигура 4C), 10 мкг/мл анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фигура 4D), 5 мкг/мл анти-CD137 антитела rab2225 (фигура 4E) или интервала дозы (12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл) анти-OX40 антитела rab1928 в течение 5 суток. Супернатанты собирают, и измеряют титры IL-2 с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат.№ AL221C). Анти-TIGIT антитела rab2197 и rab2196 получают на основе последовательностей варибельного участка антител 10A7 и 1F4, соответственно, описанных в публикации заявки на патент США № US2013/0251720 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Анти-CD137 антитело rab2225 получают на основе последовательностей варибельного участка антитела 20H4, описанного в патенте США № 8137667 (полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Анти-OX40 антитело rab1928 получают на основе последовательностей варибельного участка антитела Hu106-122, описанного в публикации заявки на патент США № US 2013/0280275 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител приводятся в таблице 8.

Таблица 8. Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
------------	----------	-----------------------------------

66	rab2197, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWV RQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNA KNLLFLQMNDLKSEDTAMYICARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	rab2197, легкая цепь	DIVMTQSPSSLAIVSPGEEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENL LAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTD YTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	rab2196 тяжелая цепь	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWW KQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRFGFYAMDYWGQG TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	rab2196 легкая цепь	DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISSCRSSQSLVNSYGNFTLS WYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
70	rab2225 тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSGYYWSWI RQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWFYDLWGR GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

71	rab2225 легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLT LEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	rab1928 тяжелая цепь	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHVV RQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANPYDYVSYAMDYW GQGTTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD KTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
73	rab1928 легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYLYTGVPSRFSGSGSGTDFFTISS LQPEDIATYYCQQHYSTPRTFGQGTKLEIKRSVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00326] Анти-PD-1 антитело AGEN2034w, или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом ипилимумабом (фигура 4C), анти-TIGIT антителом rab2197 или rab2196 (фигура 4D), анти-CD137 антителом rab2225 (фигура 4E) или анти-OX40 антителом rab1928 (фигура 4F), усиливает продуцирование IL-2 в человеческих PBMC в присутствии суперантигена SEA.

6.1.5. Влияние связывания Fc-рецептора на антагонистическую активность анти-PD-1 антител

[00327] В этом примере проверяют влияние связывания FcγR на антагонистическую активность анти-PD-1 антител.

[00328] Сначала проверяют антагонистическую активность эталонного анти-PD-1 антитела в присутствии или в отсутствие блокаторов FcγR. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцинаTM (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в

96-луночные планшеты с поверхностью NUNCLON delta (NUNC™). Клетки культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат.№ at101red) и 10 мкг/мл эталонного анти-PD-1 антитела или изотипического контроля в присутствии или в отсутствие фиксированной концентрации блокирующего Fc-рецептор коктейля, содержащего анти-CD16 антитело (1 мкг/мл, системы R&D, кат.№ AF1330) и иррелевантный IgG₁ (25 мкг/мл, LifeTein, кат.№ LT12031), в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00329] Блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела усиливает способность эталонного анти-PD-1 антитела индуцировать секрецию IL-2 в таком анализе первичных человеческих PBMC (фигура 5A).

[00330] Подобное исследование проводят для проверки влияния блокады FcγR на антагонистическую активность AGEN2034w. Коротко, человеческие PBMC культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат.№ at101red), 10 мкг/мл AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом (HEL IgG₁, LifeTein, кат.№ LT12031), и 20 мкг/мл анти-CD16 антитела (Biolegend, кат.№ 302013), анти-CD32 антитела (eBioscience, кат.№ 16-0329-81), которое связывается как с CD32A, так и с CD32B, анти-CD64 антитела (Biolegend, кат.№ 305016) или изотипического контроля (Biolegend, кат.№ 400543) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00331] В соответствии с результатом на фигуре 5A, блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела повышает секрецию IL-2, вызванную AGEN2034w, в таком анализе первичных человеческих PBMC (фигура 5B).

[00332] Далее, получают три мутанта Fc IgG₁ AGEN2047w (мутант N297A, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU) и сравнивают против AGEN2047w, которое включает константный

участок IgG₁ дикого типа, в анализе человеческих PBMC с SEA, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC инкубируют со 100 нг/мл SEA и 10 мкг/мл анти-PD-1 антител AGEN2047w, AGEN2047w-N297A, AGEN2047w-S267E/L328F, AGEN2047w-S239D/A330L/I332E или изотипических контрольных антител с соответствующими Fc участками дикого типа или мутантными.

[00333] Как видно на фигуре 5C, мутант N297A с пониженным связыванием FcγR дополнительно усиливает секрецию IL-2. Напротив, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, которые оба имеют усиленное связывание FcγR, индуцируют меньшее продуцирование IL-2, чем индуцирует AGEN2047w дикого типа.

6.1.6. Влияние анти-PD-1 антитела на реакцию в смешанной культуре лимфоцитов

[00334] Далее, анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют в реакции в смешанной культуре лимфоцитов. Дендритные клетки, полученные из изолированных CD14⁺ клеток (Stemcell Technologies, кат.№ 18058), полученных из криоконсервированных HLA-A2⁺ человеческих PBMC и дифференцированных сначала в присутствии 500 Е/мл IL-4 (Peprotech, кат.№ 200-04-20UG) и 1000 Е/мл GM-CSF (Peprotech, кат.№ 300-03-20UG) в течение 24 часов и затем в присутствии 1000 Е/мл TNFα (Peprotech, кат.№ 300-01A-50UG), 10 нг/мл IL-1β (Peprotech, кат.№ 200-01B-10UG), 10 нг/мл IL-6 (Peprotech, кат.№ 200-06-20UG) и 1 мкМ PGE2 (Sigma, кат.№ P0409-5MG) в течение еще 24 часов. Отобранные 50000 Т-клеток, очищенных от аллогенного донора HLA-A2 человеческих PBMC очисткой на колонке MACS (Miltenyi Biotec, кат.№ 130-096-535), культивируют совместно с 10000 дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии 10 мкг/мл изотипического контрольного антитела человеческого IgG₄ (Biolegend, кат.№ 403402) или 10 мкг/мл AGEN2034w в RPMI (Corning, кат.№ 10-040-CM), содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (Corning, кат.№ 35-060-CI) и пенициллин/стрептомицин (Gibco, кат.№ 15140-122). Культуры инкубируют в течение 5 суток при 37°C и 5% CO₂. Супернатанты оценивают на стационарные концентрации IFNγ с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат.№ AL217C).

[00335] Как видно на фигуре 6, AGEN2034w индуцирует продуцирование IFN γ в совместной культуре очищенных человеческих Т-клеток и полученных *in vitro* аллогенных дендритных клеток.

6.1.7. Действие анти-PD-1 антитела в анализе на супрессию асцитических жидкостей

[00336] В этом примере анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют на его способность ослаблять супрессию пролиферации Т-клеток, вызванную асцитической жидкостью при раке яичников. Коротко, первичные человеческие PBMC метят CFSE (Biolegend, кат.№ 423801) и затем стимулируют 1 мкг/мл анти-CD3 антитела (eBioscience, кат.№ 16-0037-85) и 50%, объем/объем, асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии возрастающих концентраций (0,00000102-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела IgG₄ (Biolegend, кат.№ 317434) в течение 4-5 суток. Клетки окрашивают иммуно античеловеческим CD4 антителом (Biolegend, кат.№ 317434) или античеловеческим CD8 антителом (Biolegend, кат.№ 344710) и красителем для определения жизнеспособности LIVE-DEAD (Life Technologies, кат.№ L10119). Пролиферацию CD4+ или CD8+ Т-клеток, как иллюстрирует разведение CFSE, измеряют проточной цитометрией с использованием BD Fortessa (Becton Dickinson).

[00337] Как видно на фигурах 7А-7С, совместное культивирование с асцитической жидкостью при раке яичников снижает пролиферацию стимулированных анти-CD3 антителом Т-клеток, и такое снижение может быть частично ослаблено анти-PD-1 антителом AGEN2034w.

6.1.8. Действие анти-PD-1 антитела в репортерном анализе клеток Юрката NFAT-люциферазы

[00338] Кроме того, репортерный анализ используют для зондирования антагонистической активности AGEN2034w. Конкретно, в таком репортерном анализе совместная культура PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней и PD-1-экспрессирующих репортерных клеток ингибирует экспрессию NFAT-люциферазного репортерного гена в репортерных клетках. Блокада взаимодействия PD-1/PD-L1 анти-PD-1 антителом может ослабить сигнал

ингибирования, что ведет к экспрессии люциферазы.

[00339] Коротко, PD-L1+ CHOК1 клетки-мишени (Promega, кат.№ CS187108) культивируют совместно с GloResponse™ NFAT-luc2/PD-1 репортерные клетки Юрката (Promega, кат.№ CS187102) в присутствии возрастающих концентраций (0-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в среде RPMI-1640 (Corning, кат.№ 21-040-CV) с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS (Gemini, кат.№ 100-106). После 6 часов инкубации определяют эффективность AGEN2034w в ослаблении супрессии репортерного гена, индуцированной связыванием PD-L1 с PD-1, определяя люциферазу с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, кат.№ G7941).

[00340] Как видно на фигуре 8, анти-PD-1 антитело AGEN2034w усиливает передачу сигнала TCR в зависимости от дозы в таком репортерном анализе Юрката-NFAT-люцифераза.

6.2. Пример 2. Характеризация дополнительных анти-PD-1 антител

[00341] В этом примере характеризуют следующие шесть дополнительных анти-PD-1 антител: AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_p11_B03, EP11_p11_B05, EP11_p11_C02 и EP11_p11_C03. Последовательности вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цеп этих антител раскрыты в таблице 6.

6.2.1. Анализ анти-PD-1 антител на связывание и блокаду лиганда

[00342] Аффинность шести анти-PD-1 антител, описанных выше, анализируют поверхностным плазмонным резонансом. Все шесть антител связываются с рекомбинантным человеческим PD-1 (данные не приводятся).

[00343] Активность блокирования лигандов шести анти-PD-1 антител проверяют с использованием технологии «suspension array» в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.3. Объединенные гранулы инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при двукратном повторе (конечные концентрации от 7,5 мкг/мл до 0,001 мкг/мл на лунку) в течение 1 часа при 20°C и 650 об/мин. Затем добавляют меченный R-PE PD-L1-Fc (R&D

Systems, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (R&D Systems, кат.№ 1224-PL). Испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_p11_B03, EP11_p11_B05, EP11_p11_C02 и EP11_p11_C03. Как видно на фигурах 9A-9F, все испытываемые анти-PD-1 антитела блокируют связывание PD-1 с PD-L1 и PD-L2 в зависимости от дозы.

6.2.3. Влияние анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEF)

[00344] Функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w на человеческих PBMC проверяют в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.4. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), культивируют в присутствии 10 мкг/мл анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного антитела (HEL IgG₁, LifeTein, кат.№ LT12031) и 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technologies, кат.№ at101red) в течение 4 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00345] Как видно на фигуре 10, анти-PD-1 антитело AGEN2002w повышает продуцирование IL-2 первичными человеческими PBMC при наличии стимуляции SEA.

6.3. Пример 3. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела

[00346] Эпитоп анти-PD-1 антитела AGEN2034w характеризуют с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX) и анализа Pepscan.

6.3.1. Картирование эпитопа анти-PD-1 Fab с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX)

[00347] Взаимодействие фрагмента Fab AGEN2034w (AGEN2034w-Fab) с внеклеточным доменом человеческого PD-1 исследуют масс-спектрометрией водородно-дейтериевого обмена (HDX).

[00348] Рекомбинантный меченный His человеческий PD-1 получают от Sino Biological Inc (Cat# 10377-H08H). При использовании дегликозилированного PD-1 его получают из 300 мкг

рекомбинантного меченного His белка человеческого PD-1 инкубацией с 6 мкл PNGазы F при 37°C в течение 4 часов. Фрагмент Fab анти-PD-1 антитела получают из AGEN2034w путем обработки протеазой.

[00349] Для расщепления пепсином/протеазой XVIII 4,0 мкг нативного или дегликозилированного человеческого PD-1 в 125 мкл буфера для контроля (50 мМ фосфата, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) денатурируют, добавляя 135 мкл 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составляет 2,5), и инкубируют смесь в течение 3 минут при 11°C. Затем смесь подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII, используя колонку, набитую пепсином/протеазой XVIII на месте, и полученные пептиды анализируют с использованием системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ Waters Acquity в сочетании с квадрупольным с орбитальной ловушкой масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid (Thermo). Пептиды разделяют на колонке 50 мм × 1 мм, C8, с 19-мин градиентом 2-27% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Идентификацию пептидов осуществляют через поиск данных МС/МС против последовательности человеческого PD-1 с помощью Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 10 ч/млн и 0,05 Да, соответственно.

[00350] Инкубируют 10 мкл человеческого PD-1 (4,0 мкг) или 10 мкл смеси человеческого PD-1 и Fab (4,0 мкг, 4,0 мкг) со 125 мкл буфера для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) в течение 0 секунд, 60 секунд, 600 секунд и 3600 секунд при 11°C. Обмен водород/дейтерий гасят, добавляя 135 мкл раствора 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составляет 2,5). Затем погашенные образцы подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII и анализу ЖХ-МС, описанным выше. Масс-спектры регистрируют только в моде МС.

[00351] Необработанные данные МС обрабатывают с использованием программы HDX WorkBench для анализа данных МС обмена Н/Д (J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2012, 23 (9), 1512-1521, включена полностью в настоящее описание в качестве ссылки).

Уровни дейтерия вычисляют с использованием среднего различия в массе между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t_0).

[00352] Покрытие последовательности 85,4% достигают для дегликозилированного человеческого PD-1 без метки His. Большинство пептидов PD-1 отображает идентичные или схожие уровни дейтерия в присутствии и в отсутствие Fab против человеческого PD-1. Однако обнаружено, что некоторые пептидные сегменты имеют существенно сниженные уровни включения дейтерия после связывания Fab. Все остатки в этом абзаце нумерованы согласно SEQ ID NO: 74. Дегликозилированный человеческий PD-1 показывает сильное снижение поглощения дейтерия после связывания с Fab против человеческого PD-1 в остатках 107-122 (SLAPKAQIKESLRAEL) (SEQ ID NO: 75). Кроме того, снижение поглощения дейтерия после связывания с Fab против человеческого PD-1 можно наблюдать в остатках 5-22 (LDSPDRPWNPTFSPALL) (SEQ ID NO: 76).

6.3.2. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела с использованием анализа Pepscan

[00353] Связывание анти-PD-1 антитела AGEN2034w измеряют против фрагментов синтезированного пептида PD-1, полученных в виде пептидной матрицы, связанной с чипом. Анализ выполняют в Pepscan Presto BV, Lelystad, Нидерланды. Коротко, для реконструкции эпитопов человеческого PD-1 синтезируют библиотеку пептидов. Носитель аминифункционализированный полипропилен получают прививкой патентованного препарата гидрофильного полимера с последующим взаимодействием с трет-бутоксикарбонилгексаметилендиамином (BocHMDA), используя дициклогексилкарбодиимид (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBT), и затем отщеплением Boc-групп с использованием трифторуксусной кислоты (ТФК). Используют стандартный Fmoc-пептидный синтез для синтеза пептидов на аминифункционализированном твердом носителе с помощью модифицированной по заказу жидкости JANUS, управляющей расположением (Perkin Elmer). Синтез структурных миметиков проводят с использованием патентованной технологии химически связанных пептидов на каркасах (CLIPS) Pepscan. Технология CLIPS позволяет пептидам структурироваться в одинарные петли, двойные

петли, тройные петли, листообразные складки, спиралеобразные складки и их комбинации. Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов проверяют в ELISA на основе PEPSCAN. Пептидные матрицы инкубируют с раствором первичного антитела в течение ночи при 4°C. После промывки пептидные матрицы инкубируют с конъюгатом козьего античеловеческого HRP (Southern Biotech, кат.№ 2010-05) в течение одного часа при 25°C. После промывки добавляют пероксидазный субстрат сульфонат 2,2'-азиноди-3-этилбензтиазолина (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H₂O₂. Спустя один час отмечают проявление окраски и определяют количественно с помощью прибора с зарядовой связью (CCD) -камеры и системы обработки изображения.

[00354] Исследование Pepscan показывает, что анти-PD-1 антитело AGEN2034w узнает отрезки человеческого PD-1, включая остатки 6-15 (DSPDRPWNPP) (SEQ ID NO: 77), остатки 130-138 (EVPTAHNPS) (SEQ ID NO: 78) и остатки 106-113 (ISLAPKAQ) (SEQ ID NO: 79), нумерованные согласно SEQ ID NO: 74.

* * *

[00355] Изобретение по объему не ограничивается конкретными воплощениями, описанными в настоящем описании. В действительности различные модификации изобретения, кроме описанных, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00356] Все ссылки (например, публикации или патенты или заявки на патент), цитированные в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок и для всех целей в такой степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент или заявка на патент) была конкретно и отдельно указана как включенная полностью в качестве ссылки для всех целей. Другие воплощения находятся в рамках следующей далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1 человека, содержащее переменный участок тяжелой цепи (VH), включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи (VL), включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 аминокислотной последовательности VH, представленной в SEQ ID NO: 15, 17 или 26-31; и

(b) VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 аминокислотной последовательности VL, представленной в SEQ ID NO: 16.

2. Выделенное антитело по п.1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 определены в соответствии со схемой нумерации, выбранной из группы, состоящей из: Kabat, Chothia, IMGT, MacCallum RM et al. и AbM.

3. Выделенное антитело по п.1, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 34-36;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 7 и 37;

(d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7; или 1, 36 и 7, соответственно;

(e) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4;

(f) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5; и/или

(g) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6.

4. Выделенное антитело по п. 1 или 2, где:

(a) переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGHV3-33 человека; и/или

(b) переменная часть тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

5. Выделенное антитело по любому из пп.1-4, где указанное антитело содержит константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 человека; и/или константный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из легкой цепи каппа человека и легкой цепи лямбда человека.

6. Выделенное антитело по любому из пп. 1-5, где указанное антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG человека, который представляет собой вариант константного участка тяжелой цепи дикого типа IgG человека, причем вариант константного участка тяжелой цепи IgG человека:

(a) связывается с Fc-рецептором человека с более низкой аффинностью, чем соответствующий константный участок тяжелой цепи дикого типа IgG человека; или

(b) представляет собой вариант константного участка тяжелой цепи IgG1 человека, вариант IgG2 человека или вариант IgG4 человека.

7. Выделенное антитело по п.6, где Fc-рецептор человека представляет собой FcγR или FcγRIIB.

8. Выделенное антитело по любому из пп. 1-7, где:

(a) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG1 человека, в котором отсутствует гликановый фрагмент в положении N297, в соответствии с системой нумерации EU;

(b) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG1 человека, содержащий мутацию N297A, в соответствии с системой нумерации EU;

(c) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG1 человека, содержащий мутацию N297Q, в соответствии с системой нумерации EU;

(d) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG1 человека, содержащий мутацию D265A, в соответствии с системой нумерации EU; и/или

(e) антитело содержит константный участок тяжелой цепи IgG4 человека, содержащий мутацию S228P, в соответствии с системой нумерации EU.

9. Выделенное антитело по любому из пп. 1-8, где указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 20-25 или 52-58.

10. Выделенное антитело по любому из пп. 1-9, где:

(a) переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, полученную из последовательности зародышевой линии IGKV3-15 человека; и/или

(b) переменный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

11. Выделенное антитело по любому из пп. 1-10, где указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

12. Выделенное антитело по любому из пп. 1-11, где

(a) антитело представляет собой человеческое антитело;

(b) антитело является антагонистом человеческого PD-1;

(c) антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность PD-1 человека;

(d) антитело ингибирует связывание PD-1 человека с PD-L1 человека или с PD-L2 человека;

(e) антитело увеличивает продукцию IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином A (SEA);

(f) антитело увеличивает продукцию IFN γ совместной культурой T-клеток человека и аллогенных дендритных клеток;

(g) антитело повышает пролиферацию анти-CD3-антителостимулированных CD4+ или CD8+ T-клеток, культивированных вместе с асцитической жидкостью при раке яичников; и/или

(h) антитело усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазных репортерных клетках, культивированных совместно с PD-L1-экспрессирующими клетками-мишенями.

13. Конъюгат антитела, содержащий выделенное антитело по любому

из пп. 1-12, конъюгированное с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или конъюгат антитела по любому из пп. 1-13 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий:

(а) переменный участок тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-12;

(b) переменный участок легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-12;

(с) переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи антитела по любому из пп. 1-12; или

(d) тяжелую цепь и легкую цепь антитела по любому из пп. 1-12.

16. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 15.

17. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 15 или вектор по п. 16.

18. Способ получения антитела, которое связывается с PD-1 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей:

(а) выделенный полинуклеотид по п. 15;

(b) выделенный полинуклеотид, кодирующий переменный участок тяжелой цепи антитела по любому из пп. 1-12, и выделенный полинуклеотид, кодирующий переменный участок легкой цепи антитела по любому из пп. 1-12; или

(с) выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-12, и выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по любому из пп. 1-12,

в условиях, обеспечивающих экспрессию полинуклеотида и продукцию антитела.

19. Способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела, конъюгата антитела или фармацевтической композиции по любому из пп.1-14.

20. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела, конъюгата антитела или фармацевтической композиции по любому из пп.1-14.

21. Способ по п.20, где рак выбран из группы, состоящей из острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака кости, глиомы ствола мозга, рака молочной железы, рака надпочечников, рака эндокринной системы, рака почек или уретры, рака паращитовидной железы, рака тонкой кишки, рака щитовидной железы, рака уретры, рака ануса, рака ротоглотки, рака пениса, рака прямой кишки, рака влагалища, рака вульвы, злокачественных заболеваний, при которых экспрессируется PD-L1, карциномы шейки матки, карциномы эндометрия, карциномы фаллопиевых труб, карциномы почечной лоханки, рака шейки матки, хронического лейкоза, хронического лимфолейкоза, хронического миелоидного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака, вызванного воздействием окружающей среды, включая рак, вызванный асбестом, плоскоклеточного рака, рака пищевода, мультиформной глиобластомы, глиомы, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярного рака, болезни Ходжкина, ВПЧ-связанные злокачественные опухоли, саркомы Капоши, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы, меланомы, метастатического рака, множественной миеломы, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), неходжкинской лимфомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, аденомы гипофиза, первичной лимфомы ЦНС, рака предстательной железы, рефрактерных или рецидивирующих злокачественных опухолей, почечно-клеточной карциномы, саркомы, саркомы мягких тканей, рака кожи, солидных опухолей у детей, опухолей спинного мозга, плоско-клеточного рака, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака яичек и карциномы эндометрия.

22. Способ по любому из пп.19-21, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутриопухолево или внутривенно.

23. Способ по любому из пп.19-22, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

24. Способ по п.23, где дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, радиотерапевтический агент или агент, нацеленный на контрольную точку.

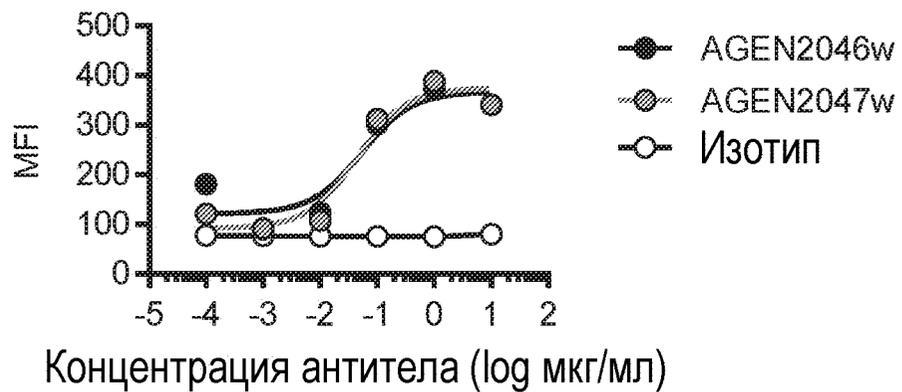
25. Способ по п.24, где агент, нацеленный на контрольную точку,

выбран из группы, состоящей из антагонистического анти-PD-1 антитела, антагонистического анти-PD-L1 антитела, антагонистического анти-PD-L2 антитела, антагонистического анти-CTLA-4 антитела, антагонистического анти-TIM-3 антитела, антагонистического анти-LAG-3 антитела, антагонистического анти-CEACAM1 антитела, антагонистического анти-TIGIT антитела, агонистического анти-CD137 антитела, агонистического анти-ICOS антитела, агонистического анти-GITR антитела и агонистического анти-OX40 антитела.

По доверенности

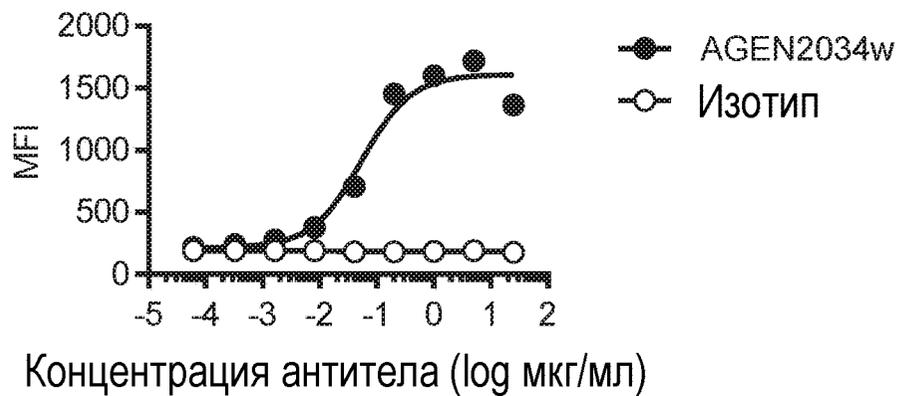
ФИГ. 1А

Стимулированные SEA человеческие Т-клетки



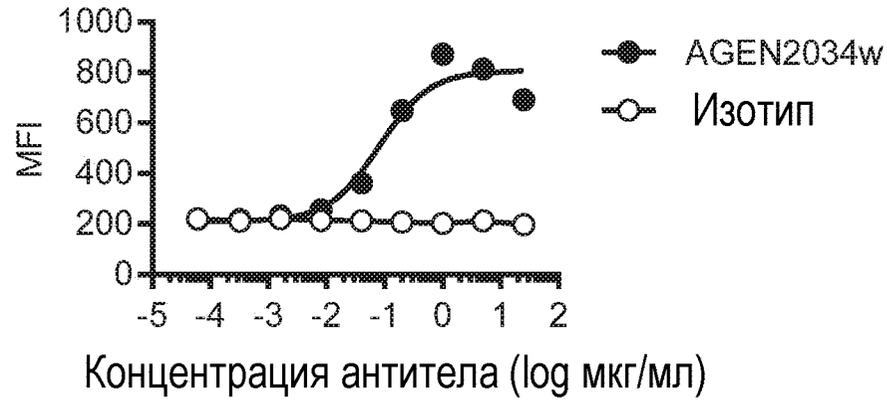
ФИГ. 1В

Стимулированные SEA человеческие Т-клетки



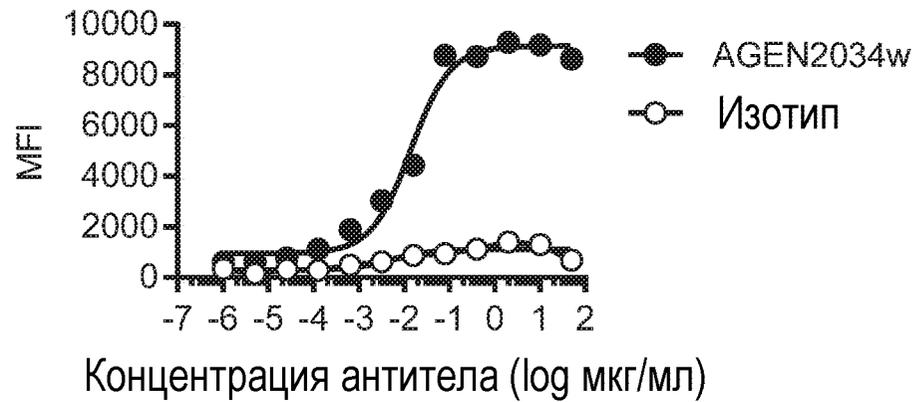
ФИГ. 1С

Стимулированные SEB Т-клетки
яванского макака

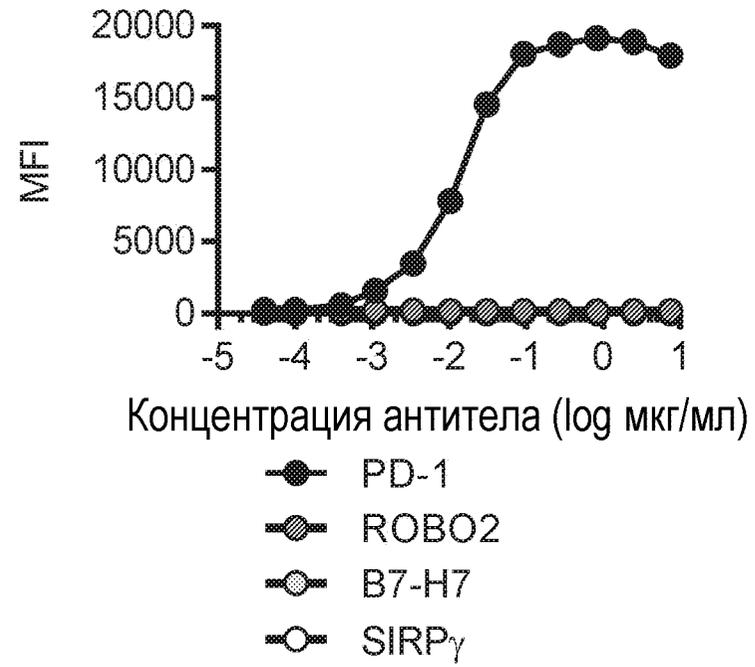


ФИГ. 1D

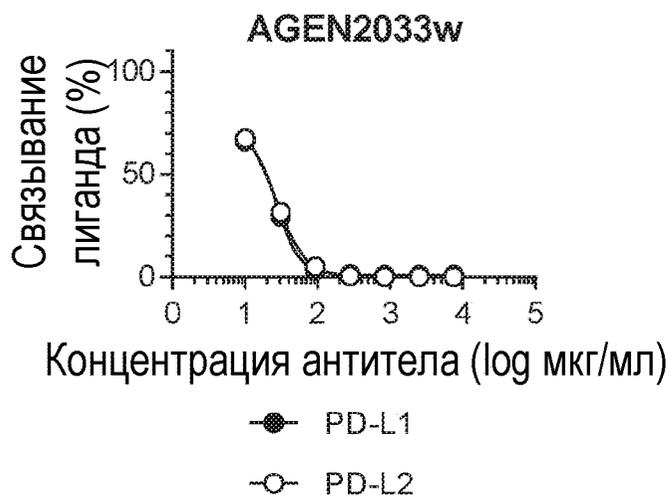
Стимулированные SEA человеческие
Т-клетки



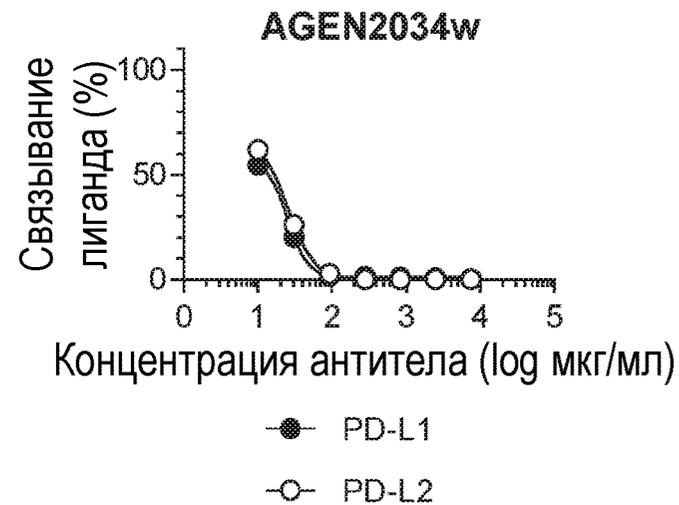
ФИГ. 2



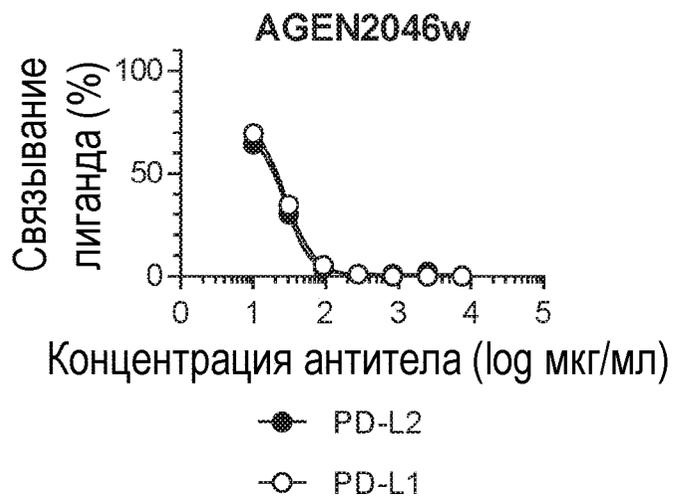
ФИГ. 3А



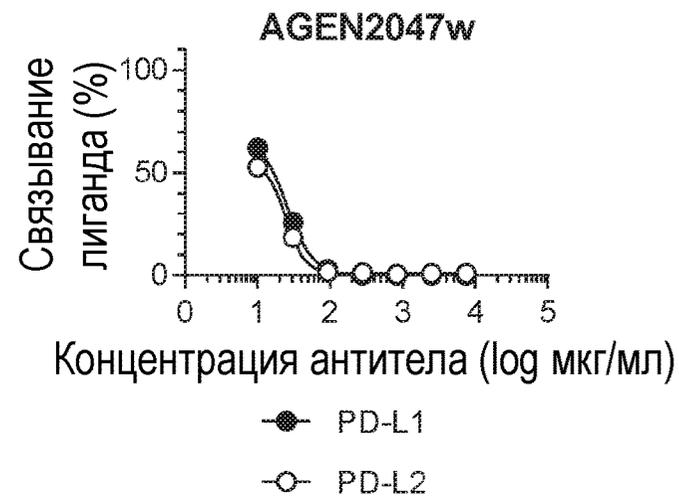
ФИГ. 3В



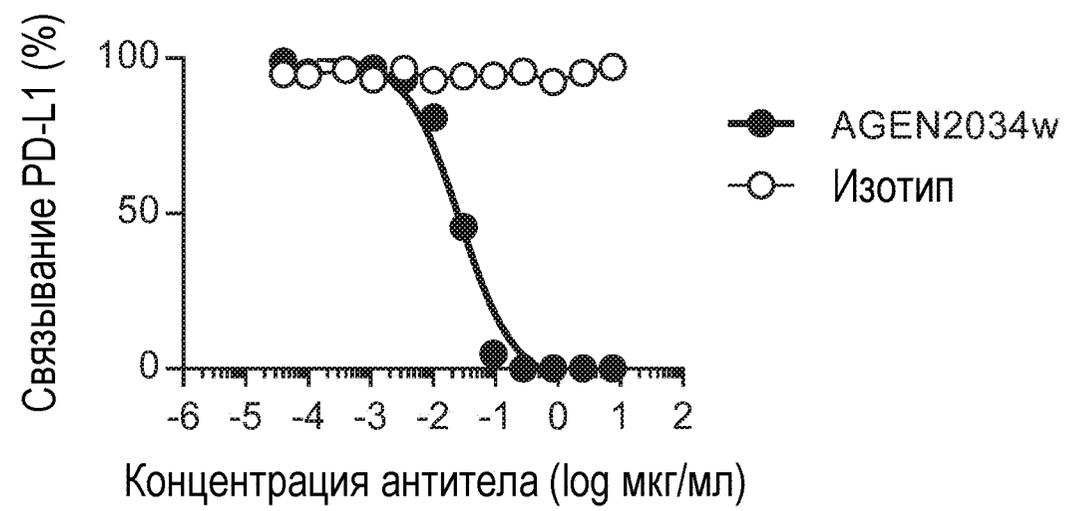
ФИГ. 3С



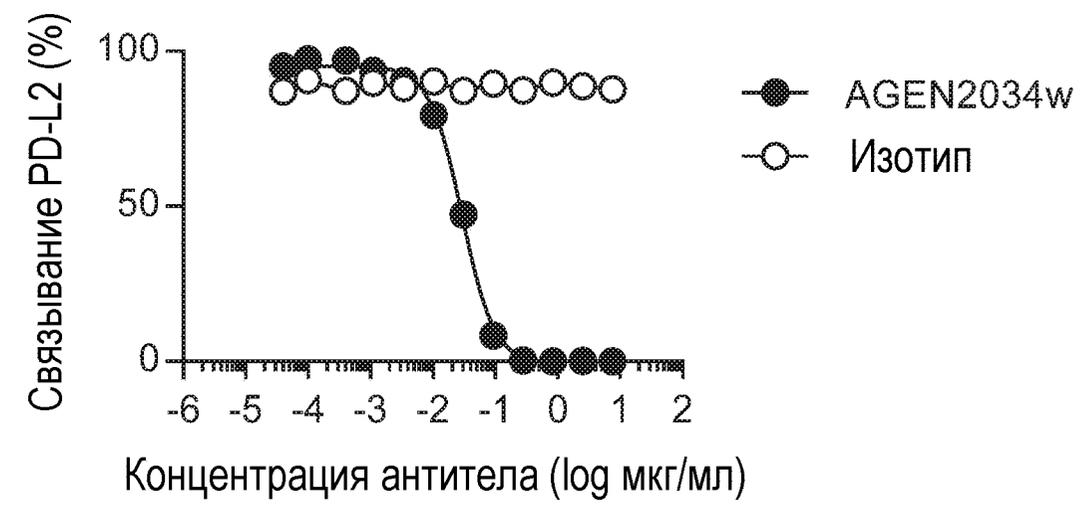
ФИГ. 3D



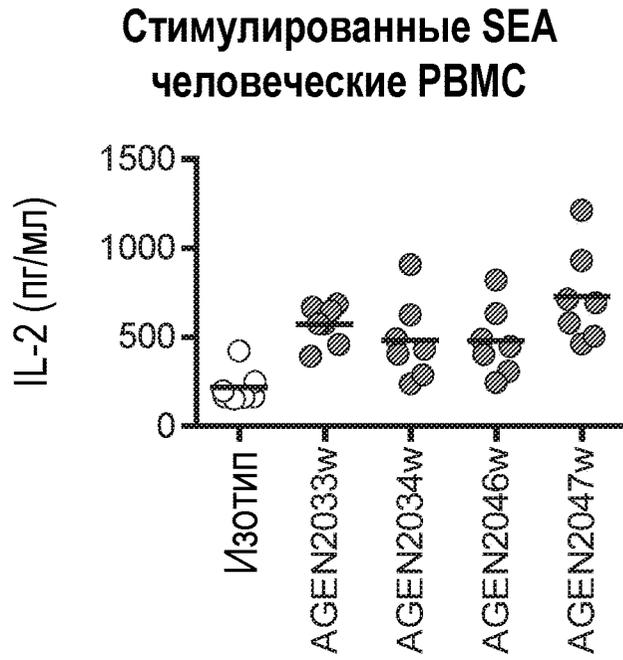
ФИГ. 3Е



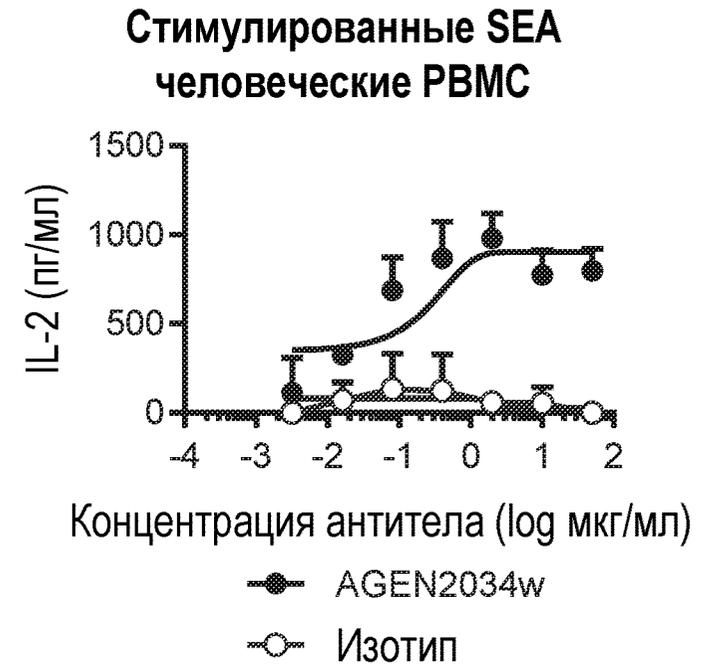
ФИГ. 3F



ФИГ. 4А

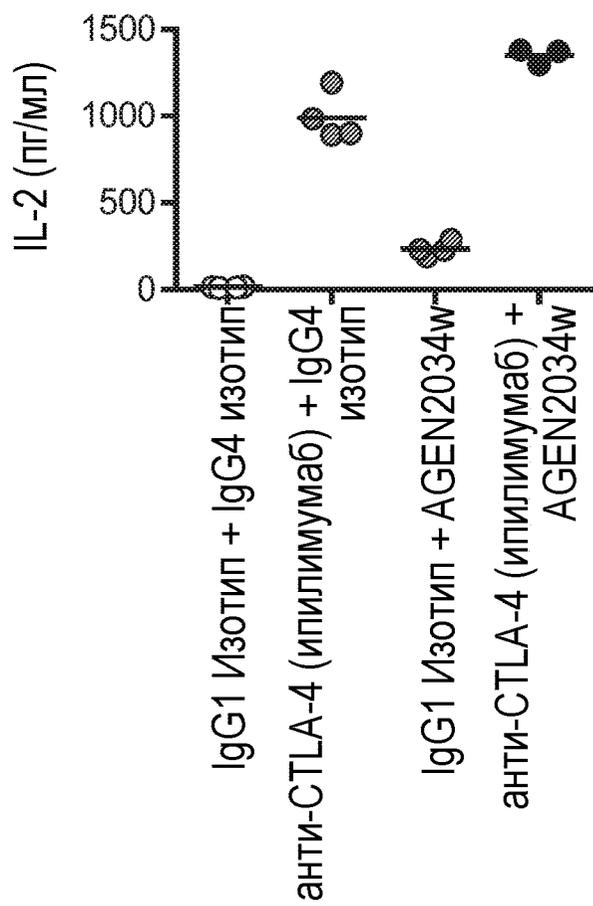


ФИГ. 4В



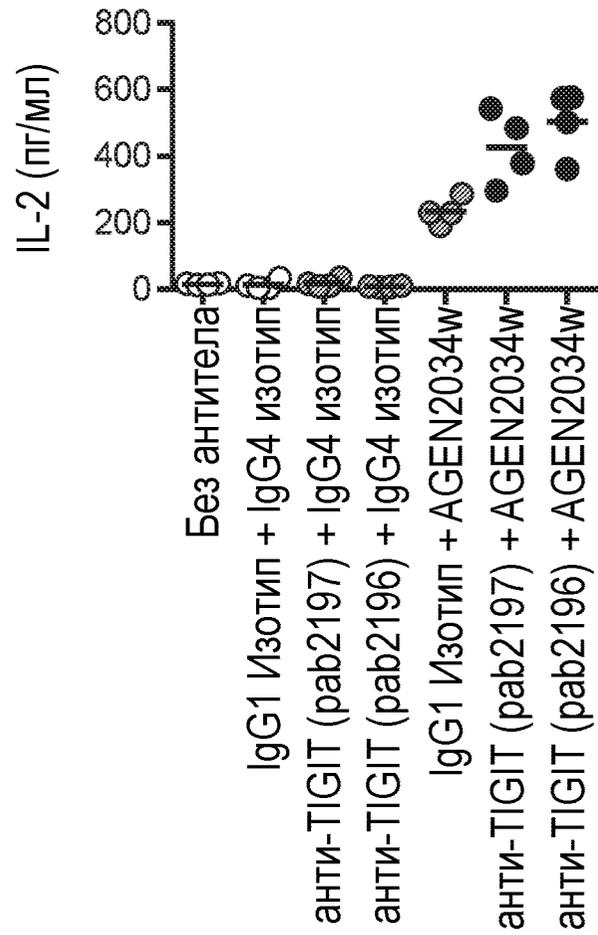
ФИГ. 4С

Комбинация с анти-CTLA-4 антителом



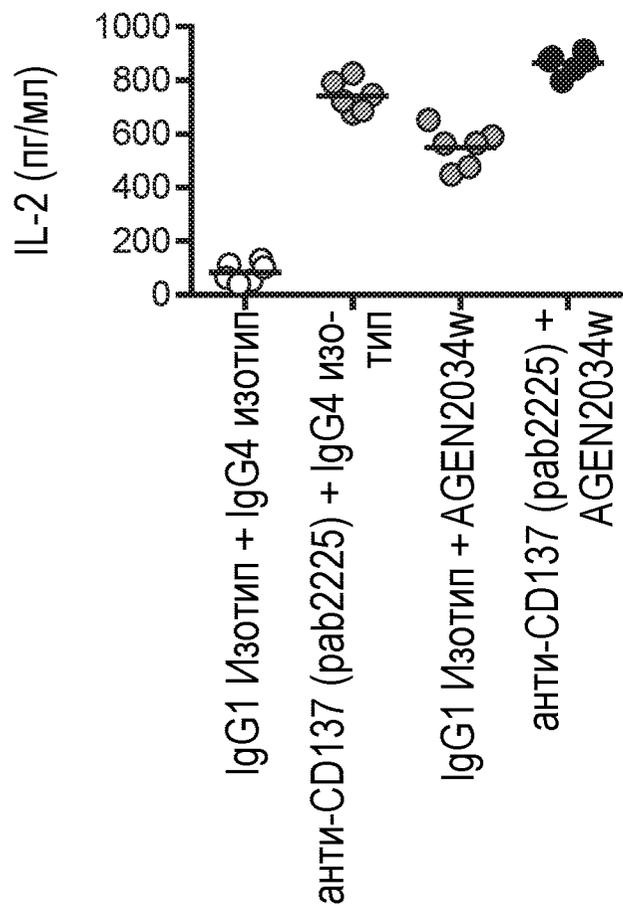
ФИГ. 4D

Комбинация с анти-TIGIT антителом



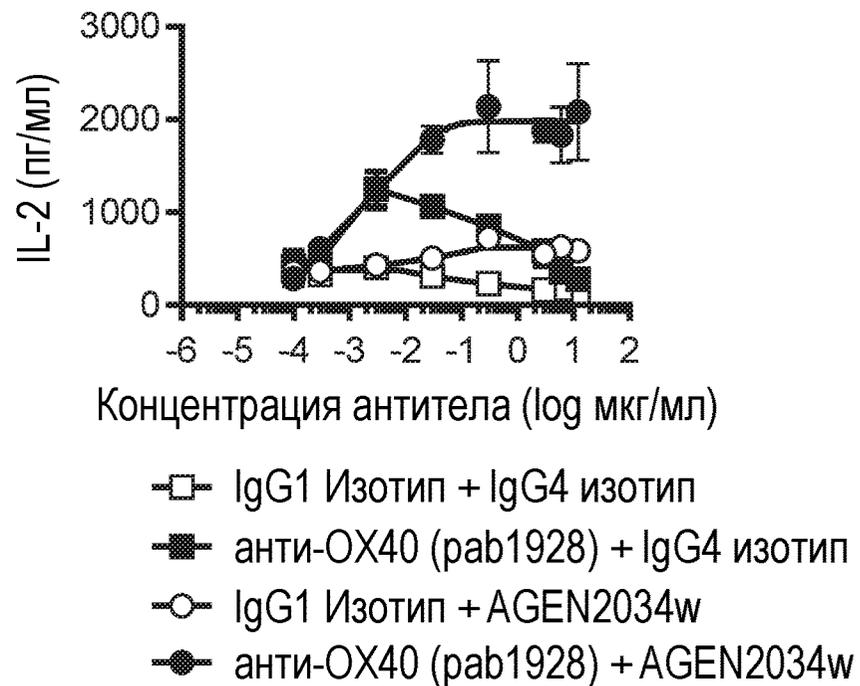
ФИГ. 4Е

Комбинация с анти-CD137 антителом



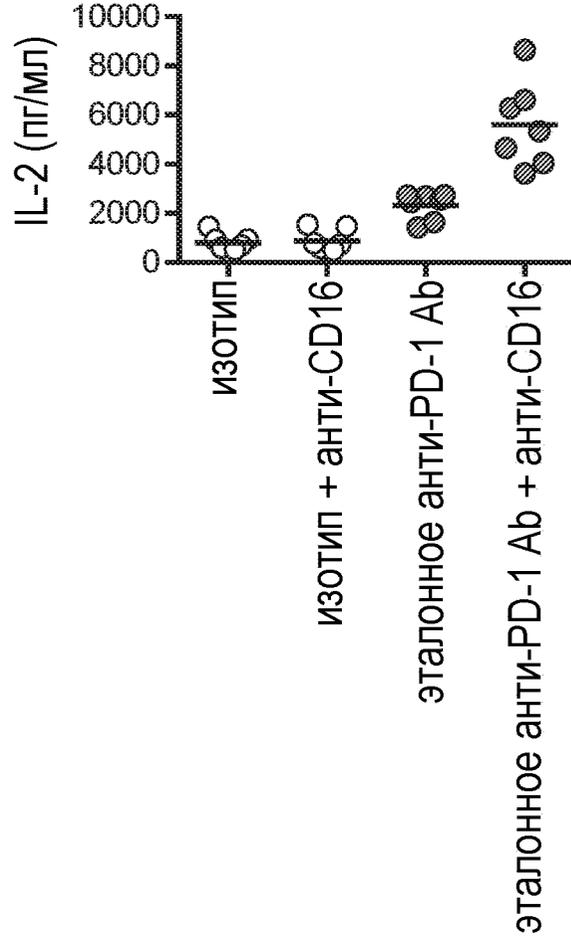
ФИГ. 4F

Комбинация с анти-OX40 антителом



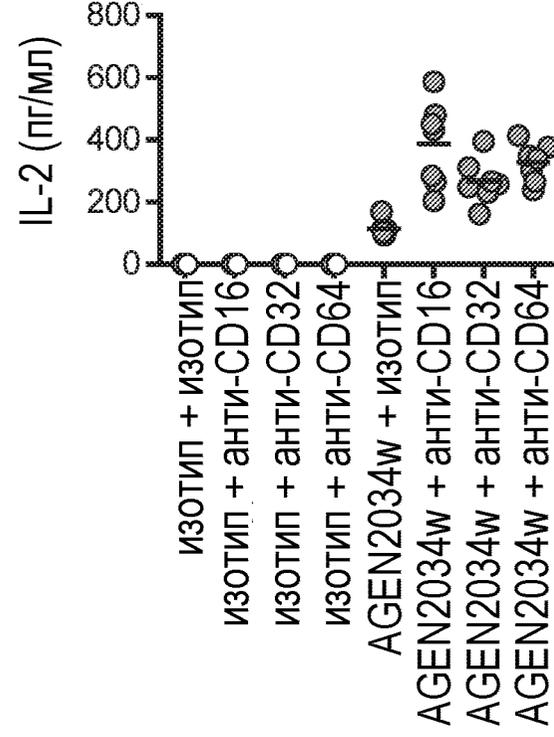
ФИГ. 5А

Стимулированные SEA человеческие PBMC



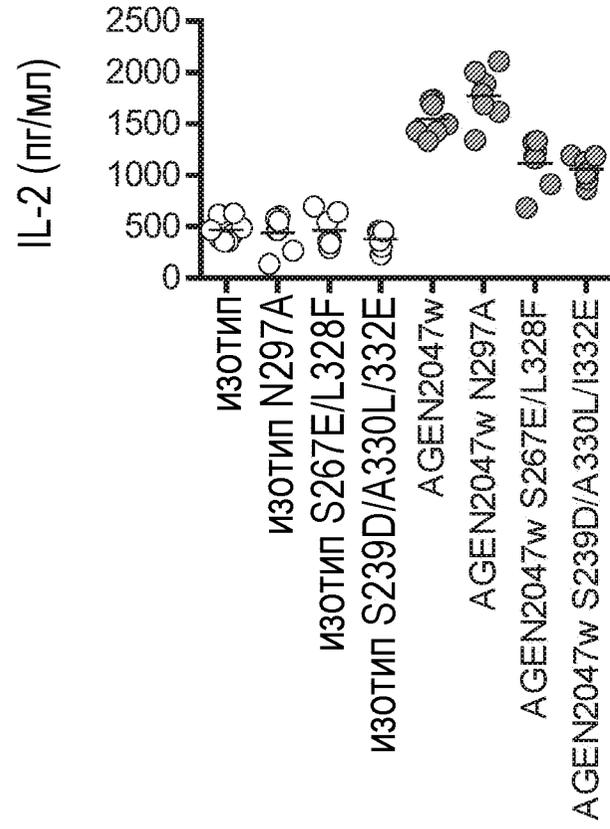
ФИГ. 5В

Стимулированные SEA человеческие PBMC

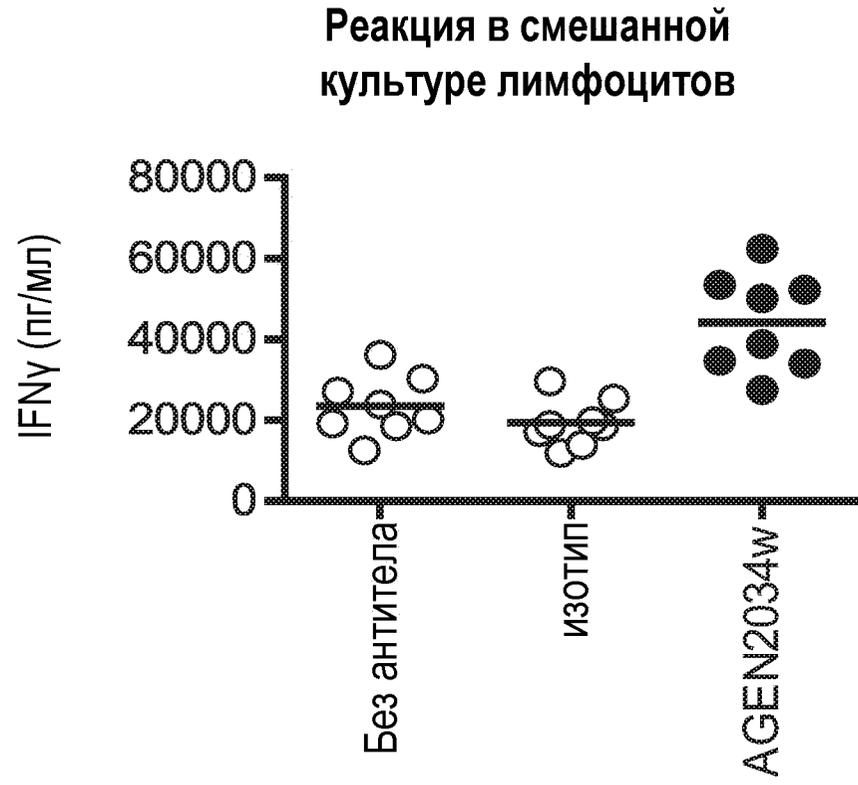


ФИГ. 5С

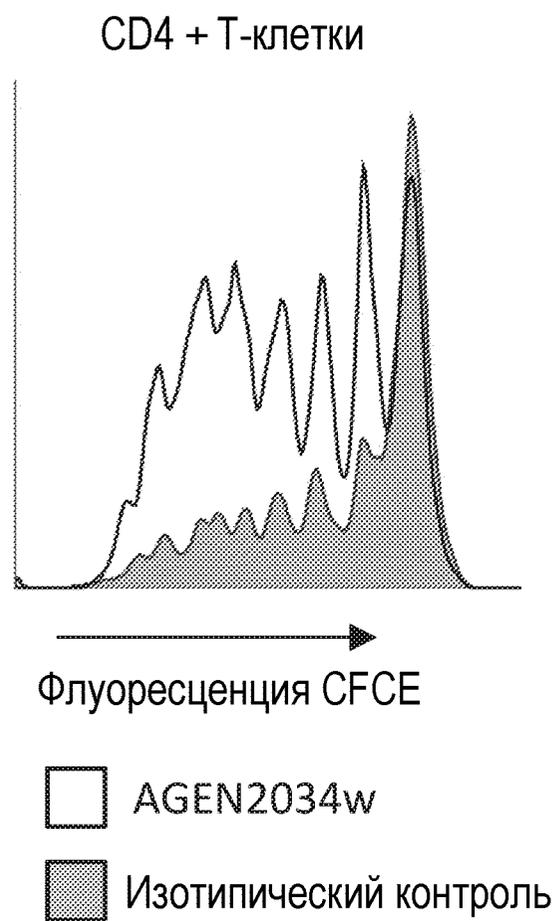
Стимулированные SEA человеческие PBMC



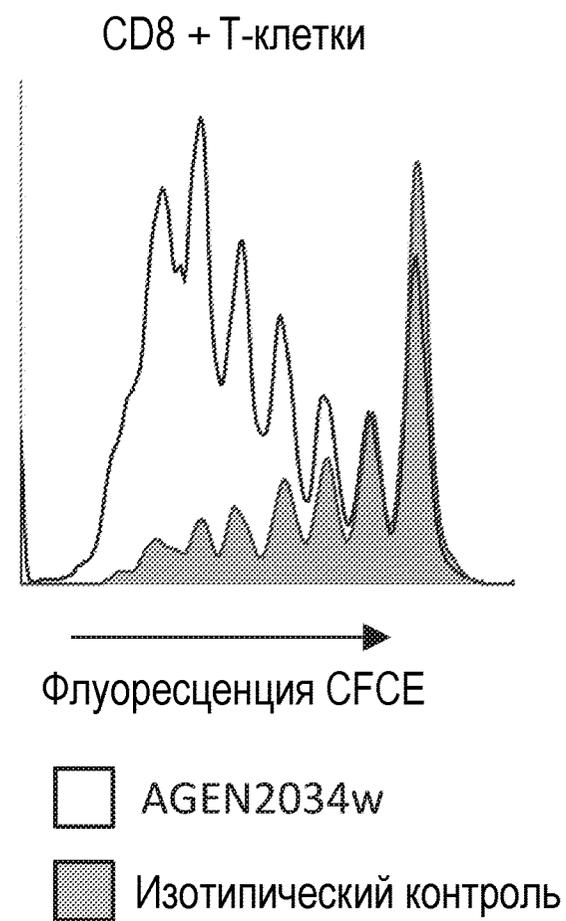
ФИГ. 6



ФИГ. 7А

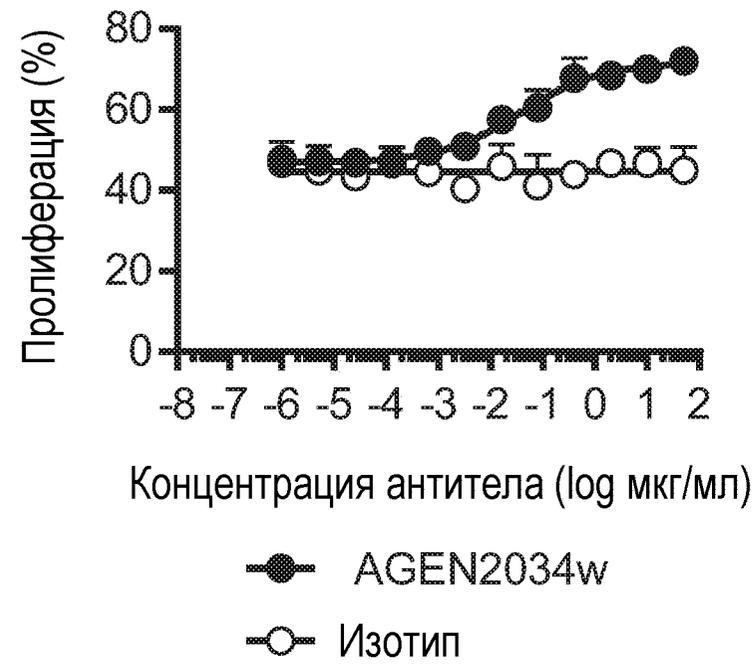


ФИГ. 7В



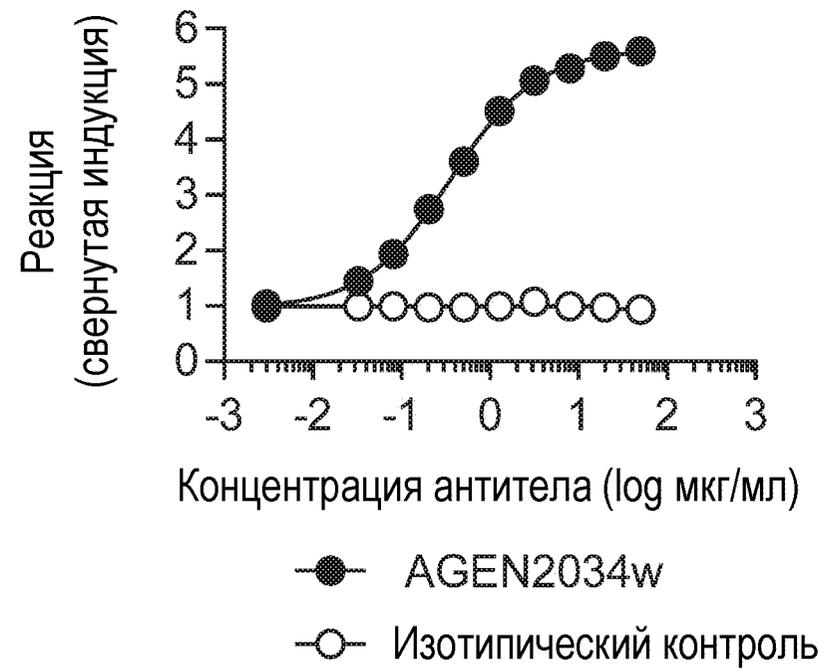
ФИГ. 7С

Анализ на супрессию асцитической жидкости

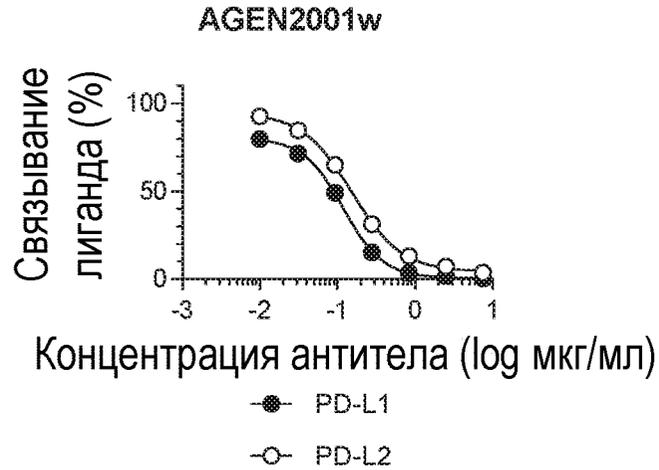


ФИГ. 8

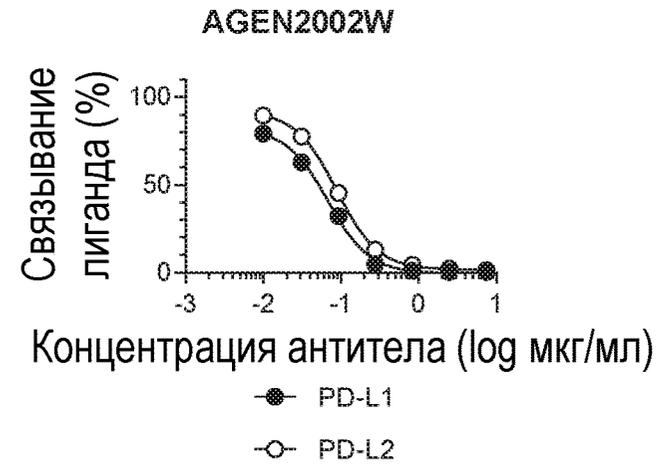
Репортерный анализ Юрката-NFAT-люциферазы



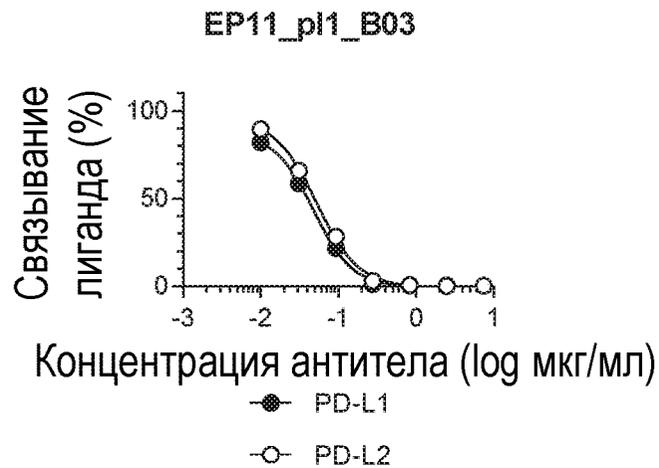
ФИГ. 9А



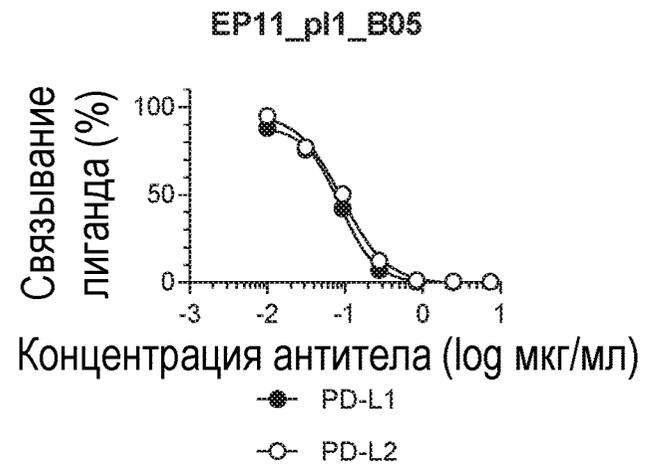
ФИГ. 9В



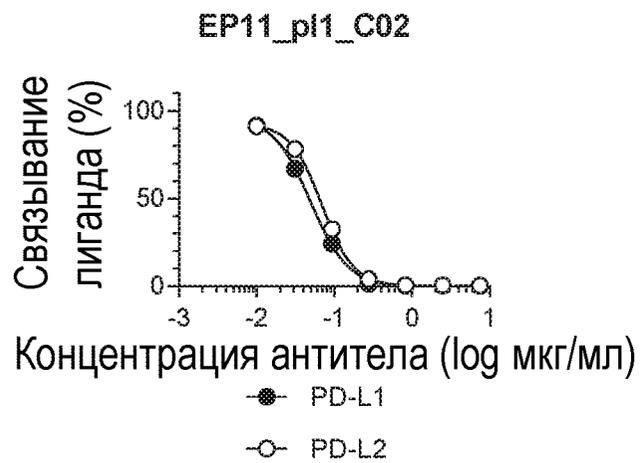
ФИГ. 9С



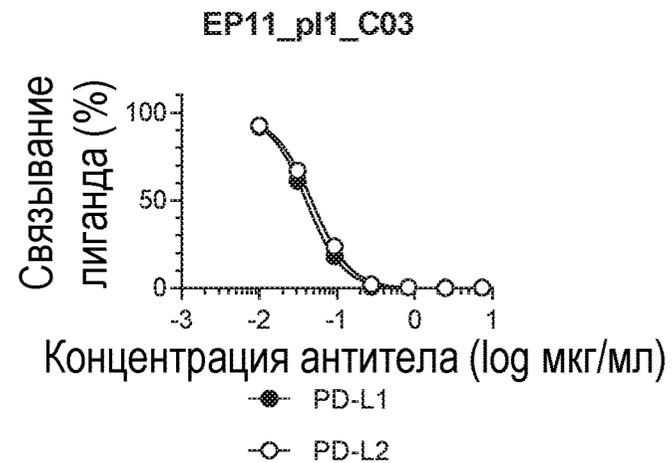
ФИГ. 9D



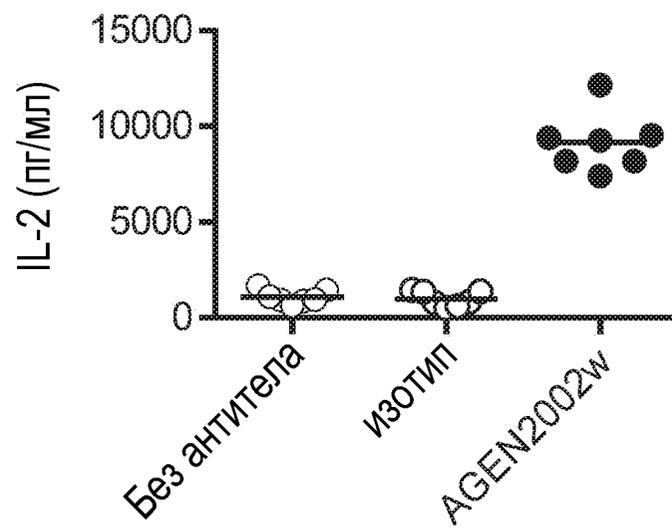
ФИГ. 9Е



ФИГ. 9F



ФИГ. 10



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 584180:AGBW-003P	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2016/049913	International filing date (<i>day/month/year</i>) 1 September 2016 (01-09-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 1 September 2015 (01-09-2015)
Applicant AGENUS INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 12 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/049913

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/049913

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 5, 10, 12, 13, 23, 27, 29(completely); 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26
32-86(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/049913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 2015/203579 A1 (PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US] ET AL) 23 July 2015 (2015-07-23)</p> <p>examples 3-5,8-9 page 3, paragraph 0034 page 19, paragraph 0178</p> <p>----- -/--</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 7 November 2016	Date of mailing of the international search report 20/01/2017
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Malamoussi, A
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049913

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 2014/356363 A1 (ZHOU HEYUE [US] ET AL) 4 December 2014 (2014-12-04)</p> <p>abstract page 20, paragraph 0173 page 20, paragraph 0174 - paragraph 0175 page 20; example 8</p> <p>-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
X	<p>WO 2014/179664 A2 (ANAPTYSBIO INC [US]) 6 November 2014 (2014-11-06)</p> <p>examples 1-3</p> <p>-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
X	<p>WO 2008/156712 A1 (ORGANON NV [NL]; CARVEN GREGORY JOHN [US]; VAN EENENNAAM HANS [NL]; DU) 24 December 2008 (2008-12-24)</p> <p>table II page 47, paragraph 3 page 48, paragraph 3 page 49, paragraph 2 table III page 54 - page 57</p> <p>-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
X	<p>US 2015/210769 A1 (FREEMAN GORDON JAMES [US] ET AL) 30 July 2015 (2015-07-30)</p> <p>example 1 page 152, paragraph 0764 - paragraph 0769</p> <p>-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
X	<p>US 8 735 553 B1 (LI KANG [CN] ET AL) 27 May 2014 (2014-05-27)</p> <p>examples 1, 2, 3, 4, 8, 12</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049913

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2006/121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]; MEDAREX INC [US]; KORMAN ALAN J; SRINIVASA) 16 November 2006 (2006-11-16)</p> <p>example 1 page 81, paragraph 1 examples 5-6, 11, 13-20, 23-24</p> <p>-----</p>	1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86
X	<p>R. MOREIRA DA SILVA: "Nivolumab: Anti-PD-1 monoclonal antibody cancer immunotherapy", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 39, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 15-24, XP055199597, ES ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2014.039.01.2103754 page 17, left-hand column, paragraph 2 page 17, left-hand column, paragraph 4 page 20, right-hand column, paragraph 4</p> <p>-----</p>	1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86
X	<p>J. MCDERMOTT ET AL: "Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer", DRUGS OF TODAY, vol. 51, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), page 7, XP055316850, ES ISSN: 1699-3993, DOI: 10.1358/dot.2015.51.1.2250387 the whole document</p> <p>-----</p>	1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86
X	<p>BENSON D M ET AL: "The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 116, no. 13, 30 September 2010 (2010-09-30), pages 2286-2294, XP002685329, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2010-02-271874 [retrieved on 2010-05-11] page 2286, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 page 2290, left-hand column, paragraph 2 - page 2291, right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/049913

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>M. SZNOL ET AL: "Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 1021-1034, XP055123957, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2063 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
A	<p>Anonymous: "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN)", WHO Drug Information Rec. Wld Health Org. Resolution EB15.R7), 1 January 2014 (2014-01-01), pages 379-422, XP055316833, Retrieved from the Internet: URL:http://www.who.int/entity/medicines/publications/druginformation/inlists/RL72.pdf?ua=1 [retrieved on 2016-11-07] page 407</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>
A	<p>KENT SHIH ET AL: "Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies", DRUGS, vol. 74, no. 17, 25 October 2014 (2014-10-25), pages 1993-2013, XP055316870, NZ ISSN: 0012-6667, DOI: 10.1007/s40265-014-0305-6 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-5, 7-10,12, 13, 17-23, 25-27, 29,32-86</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/049913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2015203579	A1	23-07-2015	AU 2015209233 A1	04-08-2016
			CA 2936075 A1	30-07-2015
			CN 106068275 A	02-11-2016
			EA 201691482 A1	30-11-2016
			EP 3097119 A1	30-11-2016
			KR 20160132010 A	16-11-2016
			SG 11201605482S A	30-08-2016
			TW 201540726 A	01-11-2015
			US 2015203579 A1	23-07-2015
			UY 35964 A	31-08-2015
			WO 2015112800 A1	30-07-2015

US 2014356363	A1	04-12-2014	CA 2913977 A1	04-12-2014
			CN 105683217 A	15-06-2016
			EP 3004169 A2	13-04-2016
			JP 2016521692 A	25-07-2016
			US 2014356363 A1	04-12-2014
			WO 2014194302 A2	04-12-2014

WO 2014179664	A2	06-11-2014	AU 2014259719 A1	17-12-2015
			CA 2910278 A1	06-11-2014
			CN 105339389 A	17-02-2016
			EP 2992017 A2	09-03-2016
			JP 2016523516 A	12-08-2016
			KR 20160034247 A	29-03-2016
			SG 11201508528T A	27-11-2015
			US 2016075783 A1	17-03-2016
			WO 2014179664 A2	06-11-2014

WO 2008156712	A1	24-12-2008	AU 2008266951 A1	24-12-2008
			BR PI0812913 A2	09-12-2014
			CA 2691357 A1	24-12-2008
			CA 2855098 A1	24-12-2008
			CN 102131828 A	20-07-2011
			CN 104945508 A	30-09-2015
			DK 2170959 T3	13-01-2014
			EP 2170959 A1	07-04-2010
			EP 2535354 A1	19-12-2012
			ES 2437327 T3	10-01-2014
			HK 1140497 A1	07-03-2014
			HR P20131167 T1	03-01-2014
			IL 202813 A	31-03-2015
			JP 5191537 B2	08-05-2013
			JP 5640052 B2	10-12-2014
			JP 2010530753 A	16-09-2010
			JP 2012254092 A	27-12-2012
			KR 20100054780 A	25-05-2010
			KR 20140133954 A	20-11-2014
			KR 20150055114 A	20-05-2015
			LU 92936 I2	29-02-2016
			NO 2015028 I1	11-01-2016
			NZ 582150 A	31-08-2012
			NZ 600758 A	27-09-2013
			PH 12015501524 A1	22-02-2016
			PT 2170959 E	07-01-2014
			RS 53072 B	30-04-2014
			SI 2170959 T1	30-04-2014
			US 2010266617 A1	21-10-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/049913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2013108651 A1	02-05-2013
		US 2013109843 A1	02-05-2013
		US 2015232555 A1	20-08-2015
		WO 2008156712 A1	24-12-2008

US 2015210769	A1	30-07-2015	AU 2015209145 A1
			CA 2935423 A1
			EP 3097121 A1
			KR 20160110995 A
			SG 11201604939S A
			TW 201536808 A
			US 2015210769 A1
			UY 35967 A
			WO 2015112900 A1

US 8735553	B1	27-05-2014	AU 2013400609 A1
			CA 2924172 A1
			CN 105531288 A
			EA 201690567 A1
			EP 3044234 A1
			JP 2016533763 A
			KR 20160044063 A
			SG 11201601844T A
			TW 201538525 A
			US 8735553 B1
			US 2015079109 A1
			US 2015315274 A1
			WO 2015035606 A1

WO 2006121168	A1	16-11-2006	AU 2006244885 A1
			BR PI0610235 A2
			CA 2607147 A1
			CN 103059138 A
			CN 105315373 A
			DK 2161336 T3
			EP 1896582 A1
			EP 2161336 A1
			EP 2418278 A2
			EP 2439272 A2
			EP 2439273 A2
			ES 2427646 T3
			HK 1140793 A1
			IL 187108 A
			IL 208642 A
			JP 4361545 B2
			JP 5028700 B2
			JP 5872377 B2
			JP 2006340714 A
			JP 2009155338 A
			JP 2012158605 A
			JP 2014077015 A
			JP 2016033135 A
			KR 20080011428 A
			KR 20130032908 A
			KR 20130114226 A
			LU 92904 I2
			NZ 563193 A
			PT 2161336 E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/049913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		RU 2010135087 A	27-02-2012
		RU 2013133714 A	27-01-2015
		TW I379898 B	21-12-2012
		US 2009217401 A1	27-08-2009
		US 2013133091 A1	23-05-2013
		US 2014212422 A1	31-07-2014
		US 2014294852 A1	02-10-2014
		US 2014328833 A1	06-11-2014
		US 2014348743 A1	27-11-2014
		US 2015165025 A1	18-06-2015
		WO 2006121168 A1	16-11-2006
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 5, 10, 12, 13, 23, 27, 29(completely); 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having the heavy and light chain CDR sequences with SEQ ID No 1-3 and 4-6, respectively, and heavy and light chain variable region with SEQ ID No 15 and 16, clones AGEN2033w and AGEN2046w.

2. claims: 6, 11, 14-16, 24, 28, 30, 31(completely); 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having the heavy and light chain CDR sequences with SEQ ID No 1, 2, 7 and 4-6, respectively, and heavy and light chain variable region with SEQ ID No 17 and 16, clones AGEN2034w and AGEN2047w.

3. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light chain variable regions with SEQ ID No 26 and 16, clone AGEN2001w.

4. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light chain variable regions with SEQ ID No 27 and 16, clone BADD426-2615.

5. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light chain variable regions with SEQ ID No 28 and 16, clone EP11_p11B03.

6. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light chain variable regions with SEQ ID No 29 and 16, clone EP11_p11B05.

7. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light chain variable regions with SEQ ID No 30 and 16, clone EP11_p11C02.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. claims: 2-4, 7-9, 17-22, 25, 26, 32-86(all partially)

relating to an anti-PD-1 antibody having heavy and light
chain variable regions with SEQ ID No 31 and 16, clone
EP11_p11C03.
